



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAGALI SOARES DOS SANTOS POZZA

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA,
SUSCEPTIBILIDADE A CONDIÇÕES DO TRATO
GASTROINTESTINAL E FERMENTAÇÃO DE
OLIGOFRUTOSE, INULINA E GOMA ACÁCIA POR
ISOLADOS DE LACTOBACILOS**

Londrina
2006

MAGALI SOARES DOS SANTOS POZZA

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA,
SUSCEPTIBILIDADE A CONDIÇÕES DO TRATO
GASTROINTESTINAL E FERMENTAÇÃO DE
OLIGOFRUTOSE, INULINA E GOMA ACÁCIA POR
ISOLADOS DE LACTOBACILOS**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof. Lúcia Helena da Silva Miglioranza

Londrina
2006

MAGALI SOARES DOS SANTOS POZZA

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA,
SUSCEPTIBILIDADE A CONDIÇÕES DO TRATO
GASTROINTESTINAL E FERMENTAÇÃO DE
OLIGOFRUTOSE, INULINA E GOMA ACÁCIA POR
ISOLADOS DE LACTOBACILOS**

BANCA EXAMINADORA

Lúcia Helena da Silva Miglioranza

Lúcio Alberto Forti Antunes

Sandra Garcia

Raúl Jorge Hernan Castro Gómez

Sueli Mayume Obara Dói

Londrina, 04 de julho de 2006.

DEDICATÓRIA

A Deus. Ao meu marido Paulo Cesar Pozza pelo amor, sacrifício e compreensão. Ao meu filho Pedro, minha vida. Aos meus pais João Batista dos Santos e Marlene Soares dos Santos pelo incentivo, pelas oportunidades oferecidas e pela companhia em Londrina, eternamente grata. Às minhas irmãs Roberta, Renata e sobrinhos Bruno, Gabriel e Marcela. Às minhas avós Laurinda Figueira Soares (*in memorian*) e Maria das Dores dos Santos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, por intermédio do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, pela oportunidade de realização do curso.

À professora Lúcia Helena da Silva Miglioranza pela orientação e amizade.

Ao professor José Eduardo Garcia pelos ensinamentos e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Sandra Garcia pelas sugestões e amizade.

À estudante Roberta Merguizo pela amizade e auxílio na condução do experimento.

À secretária da pós-graduação Sandra Rezende pela ajuda e amizade.

A todos os funcionários e técnicos do Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, em especial à Patrícia e Berenice.

Ao professor Antônio Policarpo da UNIOESTE, pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Sr. Edgar Netzel e Rosecler Baron do UNILAB – Marechal Cândido Rondon, pelo auxílio no antibiograma.

À amiga Luciana Rennó pelo grande incentivo.

Aos amigos da Pós-graduação Laisiane da Nóbrega, Luciana Mikito, Vanessa, Caroline, Mírian, Marly, Cláudio, Cristiane, Fabíola, Simone, Ricardo, Leia, Elvis, Viviane e Daniele (Genética), Luciene (Veterinária) e Flávio (Biotecnologia).

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Deixe o alimento ser teu remédio e o remédio ser teu alimento.”

Hipócrates, 2500 anos atrás.

POZZA, M.S.S. **Análise da variabilidade genética, susceptibilidade a condições do trato gastrointestinal e fermentação de oligofrutose, inulina e goma acácia por isolados de lactobacilos.** 2006. 104f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos e Medicamentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

O Experimento 1 foi conduzido para comparar características fenotípicas e genéticas de lactobacilos isolados de fezes de crianças. Para identificação molecular, utilizou-se o RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso). Foram isoladas 75 colônias, sendo pré-selecionados 30 isolados. Na análise de RAPD, verificou-se que os isolados agruparam-se em quatro clusters, sendo em um deles encontrada alta similaridade. O Experimento 2 foi conduzido para avaliar “in vitro” a capacidade de resistência dos 30 isolados a condições específicas do trato gastrointestinal, como resistência aos sais biliares, a acidez e tolerância ao fenol. Para fins comparativos, duas bactérias probióticas comerciais foram submetidas aos mesmos testes. Foram selecionados oito isolados resistentes aos sais biliares e que apresentaram comportamento diferenciado com relação a tolerância à acidez e fenol, entretanto todos os isolados cresceram na presença de uma concentração de 0,3 % de fenol. O Experimento 3 teve como objetivo verificar a fermentação de oligossacarídeos como também a resistência destas cepas a alguns antibióticos comumente utilizados em humanos. Neste experimento, foi utilizado o caldo MRS, substituindo-se a glicose por 1% de oligofrutose, inulina ou goma acácia. Para o antibiograma, empregou-se o método de difusão em placa. Os resultados obtidos evidenciaram que todas as cepas foram capazes de fermentar oligofrutose, inulina ou goma acácia em caldo MRS, permitindo a utilização em produtos simbióticos. Seis cepas foram sensíveis ao cloranfenicol e a tetraciclina e todos os isolados foram resistentes a estreptomicina, porém não foi determinado se tal resistência era intrínseca ou adquirida.

POZZA, M.S.S. Genetic variability of Isolated *Lactobacillus* spp , their susceptibility to the Gastrointestinal conditions; oligofructose, inulin and acacia gum fermentation. 2006. 104f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos e Medicamentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

Three assays were carried out for this study. The aim of the first assay was to compare by genetic and phenotypic parameter the *Lactobacillus* strains isolated from infant feces. The RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) technique was applied for molecular identification among seventy isolated colonies, and eight isolates were pre-selected. The RAPD technique results demonstrated that the strains grouped into four clusters, and a high similarity was verified in one of these clusters. The second assay was carried out to evaluate “in vitro”, the resistance of 30 strains to the specific gastrointestinal tract barriers, like bile salts, acidity and phenol tolerance. Two commercial probiotic bacteria were also compared in the same stress conditions. Eight strains were selected for bile salts resistance; however they demonstrated different levels of phenol and acidity tolerance, but they were able to grow in 0.3% phenol. The aim of the third assay was to verify the oligosaccharides fermentation by eight selected strains, as well as the resistance of these strains to antibiotics commonly used in humans. In this experiment, was used MRS medium, substituting the glucose by 1% of oligofructose, inulin or acacia gum. For the antibiogram, diffusion test was used. The obtained results evidenced that all strains were able to use oligofructose, inulin or acacia gum in MRS broth, allowing the use of those in symbiotic products. Six strains were chloramphenicol and tetracycline sensitive and all isolated were resistant to streptomycin, however it was not determined if these characteristics were intrinsic or acquired.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Reagentes do coquetel para amplificação do DNA (quantidade para uma reação)	23
Tabela 2: Fermentação de carboidratos para caracterização dos isolados de lactobacilos	26
Tabela 3: Crescimento dos isolados em leite desnatado reconstituído a 10% (LDR) em diferentes temperaturas de incubação.....	27
Tabela 4: Identificação provável dos isolados segundo a Tabela de identificação API e Manual de Bergey (1986).....	27
Tabela 5: Dados de similaridade genética entre os isolados	29

Capítulo 2

Tabela 1: Resistência aos sais biliares dos isolados após crescimento em cultivos com 0,3% de Oxgall	47
Tabela 2: Valores de médios de absorbância a 620 nm dos isolados selecionados após 10 horas de incubação à 37° em meio contendo 0,3% de sais biliares.....	48
Tabela 3: Crescimento dos isolados expostos ao ácido clorídrico (HCl 0,1 N) por até 3 horas.	54
Tabela 4: Valores determinados de pH e porcentagem de acidez dos isolados cultivados em leite desnatado reconstituído (LDR) 10%, sem e com adição de 0,3% de fenol, incubados por 3 dias a 35°C	57

Capítulo 3

Tabela 1: Contagem dos isolados em caldo MRS acrescido de 1% de oligofrutose, inulina ou goma acácia no Tempo 0 horas	74
Tabela 2: Contagem dos isolados em caldo MRS acrescido de 1% de oligofrutose, inulina ou goma acácia no Tempo 24 horas	75
Tabela 3: Valores, expressos em log, dos plaqueamentos nos tempos 0 e 24 horas (T0 - T24) utilizando diferentes oligossacarídeos	75
Tabela 4: Diâmetro do halo de inibição resultante da sensibilidade dos isolados a diferentes antibióticos (mm).....	78

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Foto da coloração de Gram do isolado L25	25
Figura 2: Dendograma de similaridade genética	31
Figura 3: Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso – RAPD de 33 isolados de <i>Lactobacillus ssp</i> empregando o primer X9	32

Capítulo 2

Figura 1: Curva de crescimento do isolado L24 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3 % de Oxgall	49
Figura 2: Curva de crescimento do isolado L4 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3 % de Oxgall	49
Figura 3: Curva de crescimento do isolado L22 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3 % de Oxgall	50
Figura 4: Curva de crescimento do isolado L19 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3 % de Oxgall	50
Figura 5: Curva de crescimento do isolado L23 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3 % de Oxgall	51
Figura 6: Curva de crescimento do isolado L5 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3 % de Oxgall	51
Figura 7: Curva de crescimento do isolado L20 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3 % de Oxgall	52
Figura 8: Curva de crescimento do isolado L12 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3 % de Oxgall	52

Capítulo 3

Figura 1: Antibiograma dos isolados selecionados L24, L5, L12, L23 e L22	79
--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
ISOLAMENTO DE <i>LACTOBACILLUS</i> SSP: MÉTODOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 MATERIAL E MÉTODOS	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2	41
SUSCEPTIBILIDADE “IN VITRO” À ACIDEZ, SAIS BILIARES E FENOL DE LACTOBACILOS ISOLADOS DE FEZES DE CRIANÇAS	42
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO 3	63
UTILIZAÇÃO DE PREBIÓTICOS POR ISOLADOS DE LACTOBACILOS E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DA TERAPIA HUMANA	64
1 INTRODUÇÃO	65
2 MATERIAL E MÉTODOS	73
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	88
ANEXO 1: CAPÍTULO 1.....	89
ANEXO 2: CAPÍTULO 2.....	100

CAPÍTULO 1

ISOLAMENTO DE *LACTOBACILLUS* ssp: MÉTODOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES

RESUMO

Este capítulo aborda o isolamento e identificação de lactobacilos por meio de métodos bioquímicos e moleculares analisando a variabilidade genética intraespecífica e variação interespecífica dos isolados com a finalidade de identificar bandas de RAPD que caracterizem as diferentes espécies. Verificou-se que os isolados agruparam-se em quatro clusters, sendo em um deles observada alta similaridade o que corrobora com os testes bioquímicos.

Palavras chave: identificação genética, microflora intestinal, RAPD.

SEARCHING FOR *LACTOBACILLUS* SSP USING BIOCHEMICAL AND MOLECULAR TECHNIQUES.

ABSTRACT

This research applied biochemical and molecular techniques for identification of *Lactobacillus* recovered from human feces. Among the isolated strains, it was analyzed the genetic variability, either intra-specific as well as inter-specifically, to identify characteristic bands by RAPD. The strains were grouped into four clusters, and a high similarity was verified in one of these clusters, agreeing with the biochemical tests.

Key words: intestinal microflora, genetic identification, RAPD.

1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal do ser humano consiste em boca, cavidade oral, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. O intestino grosso pode ser dividido anatomicamente, em regiões distintas: o ceco, o cólon ascendente, transverso, descendente e sigmoideal. Os alimentos não digeridos e não absorvidos provenientes do intestino delgado passam pelo intestino grosso antes de serem eliminados do organismo. As substâncias produzidas pelo hospedeiro, incluindo glicoproteínas da mucina, células epiteliais esfoliadas e secreções pancreáticas também são importantes substratos (MACFARLANE, ALLISON e GIBSON, 1988); sendo o cólon humano considerado o maior sítio de absorção de água e sais minerais (SULLIVAN, 1996).

Entretanto, outra característica metabólica extremamente importante é mediada pelas bactérias intestinais (FOOKS et al., 1999). A microbiota gastrointestinal pode ser considerada como um órgão do corpo humano que é rapidamente renovável e metabolicamente adaptável (MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999).

Em comparação com outras regiões do trato gastrointestinal, o intestino grosso humano é complexo, densamente colonizado tendo uma ecologia microbiana altamente diversificada. Os números bacterianos nesta região são de 10^{11} - 10^{12} por grama do conteúdo intestinal (CUMMINGS; MACFARLANE, 1991), sendo capaz de responder a variações anatômicas e físicoquímicas.

Dentre as vantagens associadas à microbiota intestinal podemos citar: manutenção da homeostase intestinal, prevenção da colonização de patógenos, metabolismo de procarcinogênicos, estimulação da imunidade intestinal, redução de distensão gasosa, melhora da produção de energia (geração de ácidos graxos de cadeia curta), metabolismo de materiais xenobióticos, redução da translocação de patógenos, produção de vitaminas, redução dos níveis de lipídeos sanguíneos, melhora da motilidade intestinal e produção de enzimas digestíveis (GIBSON; WILLIAMS, 1999).

A microflora do trato gastrointestinal humano compreende cerca de 400 diferentes espécies bacterianas, embora cerca de 30-40 gêneros estejam relacionados com 99% da microflora. Estas bactérias podem ser divididas em 3 categorias: a) microrganismos que estão presentes quase sempre em altas contagens, como por exemplo, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*, b) microrganismos que fazem parte da microflora, porém estão presentes em menores proporções, por exemplo, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* c)

microrganismos presentes em menores números e que são originados de outras regiões do corpo, como *Staphylococcus* e *Haemophilus* ou do ambiente, como *Bacillus* e *Corynebacterium* (SULLIVAN,1996).

O número de bactérias lácticas no estômago é menor que 3 log ufc/g, no íleo 2-5 log ufc/g e no cólon 4-9 log ufc/g. (ERKKILA; PETAJA, 2000).

Embora lactobacilos e bifidobactérias tenham sido isolados de todas as porções do trato gastrointestinal, o íleo terminal e o cólon, respectivamente, parecem ser os sítios preferenciais de colonização destas bactérias. (CHARTERIS; KELLY; MORELLI, 1998).

Arhné et al (2005) verificaram que a frequência de lactobacilos nas amostras de fezes de 120 crianças foi de 21% para crianças com uma semana de idade, 45% aos 6 meses de idade, 17% aos 12 meses, aumentando para 31% aos 18 meses de idade. As espécies mais comumente encontradas foram: nos primeiros dois meses, *L. rhamnosus* e *L. gasseri* além de *L. fermentum* e *L. crispatus* e, aos seis meses, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. gasserri*, *L. reuteri* e *L. delbrueckii*.

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são os principais produtos da fermentação no intestino grosso. Eles são os ânions predominantes no cólon, sendo que acetato, propionato e butirato produzidos perfazem 85-95% dos AGCC totais em toda região colônica. Embora os produtos da proteólise intestinal sejam considerados tóxicos à saúde humana, os produtos da fermentação de carboidratos, (os AGCC) podem, algumas vezes, contribuir positivamente na digestão e metabolismo do hospedeiro, além de atenuar os efeitos dos produtos gerados pela degradação das proteínas (MACFARLANE; MACFARLANE, 1997).

Probióticos

Visando potencializar o efeito da microbiota benéfica no intestino, a produção de alimentos e produtos dietéticos contendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, tem aumentado significativamente nos últimos anos, sendo muitas vezes estes produtos probióticos denominados alimentos funcionais. O termo alimento funcional originou-se no Japão em 1980, sendo referente a alimentos que contém, em concentrações adequadas, a combinação de componentes os quais afetam determinadas funções no organismo resultando em efeitos celulares e fisiológicos positivos (ROBERFROID, 1996).

A palavra probiótico foi inicialmente usada por Parker (1974), para descrever organismos e substâncias que contribuem para o balanço microbiano no intestino. Havenaar e Huis In't Veld (1992) definiram probiótico como “microrganismos viáveis (bactérias ácido lácticas e outras bactérias ou leveduras empregadas na forma liofilizada ou em produtos fermentados) que exibem efeitos benéficos na saúde do hospedeiro através da melhora das propriedades de sua microflora selvagem.

Dentre os efeitos observados devido à colonização das bactérias probióticas no intestino podem ser citados: redução dos efeitos adversos observados na intolerância à lactose, controle das infecções intestinais, supressão do câncer, diminuição da concentração de colesterol e, conseqüentemente, menor incidência de doenças coronárias, melhor digestão, efeitos nutricionais e estimulação do sistema imune (FOOKS et al., 1999)

As espécies mais freqüentemente empregadas na produção de produtos lácteos probióticos são de origem intestinal humana, pois geralmente são mais adequadas às necessidades fisiológicas do hospedeiro e podem mais facilmente colonizar seu intestino do que cepas selvagens ou cepas provenientes do cólon de outros animais (GOMES; MALCATA, 1999).

As bactérias probióticas devem ser capazes de resistir a um baixo pH e sobreviver à acidez gástrica, tolerar concentrações de sais biliares presentes no trato intestinal, além de possuírem capacidade de adesão às células da mucosa intestinal, proporcionando desta forma, benefícios clínicos (MACFARLANE; CUMMINGS, 1999).

Vários estudos “*in vitro*” estimam a sobrevivência de bactérias ingeridas em relação ao trânsito através do trato gastrointestinal. Charteris, Kelly e Morelli (1998) verificaram que a máxima taxa de sobrevivência de bifidobactéria tem sido estimada em torno de 30%. Os autores também constataram que a presença de proteínas do leite, isoladas ou em combinação, exercem efeitos benéficos em relação à tolerância ao suco gástrico para algumas cepas como *L. casei* e *L. plantarum*.

Os casos de perda de viabilidade em produtos lácteos são mais comumente relacionados com *Bifidobacterium spp* e *L. acidophilus*, freqüentemente durante a estocagem refrigerada e em baixo pH, refletindo a necessidade de cuidados no critério de seleção das cepas (GOMES; MALCATA, 1999).

Dentre os microrganismos que podem ser usados em produtos probióticos podemos citar os *Lactobacillus*. Como exemplo, temos os *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii* e bifidobactérias como *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum* (SANDERS, 1999), sendo que a dosagem efetiva de *L. acidophilus* necessária para exercer

efeito benéfico no hospedeiro situa entre 10^7 - 10^9 ufc/dia. E, segundo Gomes e Malcata (1999), no momento do consumo, estes bioprodutos fermentados devem conter no mínimo 10^6 ufc/ml, pois a dosagem terapêutica é considerada como sendo entre 10^8 - 10^9 células viáveis, o que é garantido através do consumo de 100g do produto contendo entre 10^6 - 10^7 ufc/dia.

Existem situações nas quais a viabilidade não é necessária para a atividade probiótica, tais como digestão da lactose, modulação da atividade do sistema imune e efeito anti-hipertensivo. Nestes casos, os efeitos benéficos à saúde têm sido atribuído à células não viáveis ou seus componentes, atividades enzimáticas ou produtos da fermentação (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003).

Cebeci e Gürakan (2003) verificaram que cepas de *L. plantarum* também apresentam algumas propriedades importantes com grande potencial para serem utilizadas como probióticos, como a capacidade de adesão às células gastrointestinais, resistência à acidez, ao suco gástrico e a alguns antibióticos, além de produzirem plantaricina, uma substância antimicrobiana efetiva em relação a certos patógenos.

Johansson, Molin e Jeppsson (1993) isolaram e caracterizaram 250 cepas provenientes da mucosa do cólon de 75 indivíduos e forneceram o probiótico à base de lactobacilos para voluntários, e constataram que somente cinco cepas persistiram no jejuno e cólon 11 dias após o término da administração. Nesse estudo as bactérias mais comumente encontradas foram *L. plantarum* (85%), *L. rhamnosus* (23%) e *L. reuteri* (23%).

L. rhamnosus and *L. plantarum* toleram pH mais baixos do que outras bactérias, e esta propriedade as tornam adequadas para serem usadas como alimentos funcionais, possibilitando maior vida de prateleira do que quando comparadas às outras bactérias. Ashenafi e Busse (1989) desenvolveram um produto à base de soja inoculado com 1×10^6 células de *L. plantarum* e constataram sua eficiência em relação à eliminação de altas concentrações de *Enterobacteriaceae*, enterococos e *Staphylococcus aureus*.

Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

O gênero *Lactobacillus* compreende cerca de 60 espécies e subespécies, sendo sua taxonomia considerada difícil devido a ampla heterogeneidade das espécies (NIGATU et al., 2001). A caracterização genética e a manipulação de lactobacilos são essenciais para definir sua contribuição na microbiota intestinal e explorar potencialmente qualquer propriedade benéfica, pois considerando o enorme significado econômico dos

lactobacilos, este é pouco caracterizado quando comparado a outros microrganismos considerados importantes industrialmente (KLAENHAMMER, 1998).

A taxonomia bacteriana clássica é baseada em características morfológicas e fisiológicas, que incluem composição da parede celular, ácidos graxos celulares e outras características da célula. As características moleculares tornaram-se importante ferramenta taxonômica, tais como a % G+C do DNA, sendo que o gênero *Lactobacillus* possui G+C entre 33 e 55%; propriedades eletroforéticas dos produtos de gene, hibridização DNA:DNA e seqüência do RNA ribossomal (STILES; HOLZAPFEL, 1997).

Porém, atualmente, a taxonomia não é somente baseada em critérios fisiológicos como temperatura de crescimento, resistência a diferentes concentrações de NaCl, a antibióticos ou reações de fermentação, sendo também baseada em características genótípicas e fenotípicas reveladas à nível molecular. A taxonomia polifásica é a combinação de várias destas técnicas sendo capaz de diferenciar espécies que são fenotipicamente muito similares, mas genotipicamente diferentes (KLEIN et al., 1998).

Os referidos autores verificaram que a maioria das culturas usadas em produtos probióticos não possuem a designação apropriada de espécie, o que ocorre com os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, pois a maioria das bactérias definidas como *L. acidophilus* pertencem às espécies *L. johnsonii* ou *L. gasseri*. Como conseqüência, a taxonomia (incluindo identificação e classificação) é essencial para garantir a qualidade estabelecida por leis governamentais e pelo consumidor.

Uma variedade de métodos em biologia molecular estão sendo recentemente empregados para identificação de espécies probióticas de *Lactobacillus*, incluindo perfil de plasmídeos, o RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) e DNA fingerprinting ou pulsed-field eletroforese (PFGE), sendo os dois últimos métodos mais amplamente usados para discriminação entre cepas (KLAENHAMMER, 1998).

Na reação de polimerase em cadeia (PCR), a enzima polimerase replica seqüências de DNA a partir de um par de pequenos fragmentos iniciadores (primers) que flanqueiam a região que se deseja amplificar. A amplificação desta seqüência em progressão geométrica, torna possível sua visualização em gel de eletroforese em forma de bandas de DNA (MULLINS, FERRE e GIBBS, 1994).

No início da década de 90 foi proposta uma alternativa para contornar o problema do conhecimento prévio da seqüência de DNA flanqueadora do fragmento que se desejava amplificar, possibilitando a utilização da técnica em organismos onde nenhum conhecimento prévio da seqüência de DNA existia. Neste caso, utiliza-se apenas um primer,

mais curto (10 a 15 bases). A amplificação ao acaso é função da probabilidade de, após a desnaturação da fita dupla de DNA, existir no genoma uma seqüência complementar ao primer em uma das fitas, e, a uma distância que possa ser percorrida pela polimerase, uma outra seqüência complementar ao primer na fita oposta. Portanto, esta reação ocorre devido ao anelamento do primer único em pontos próximos do genoma, delimitando a região que será amplificada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Os polimorfismos, provenientes de deleções ou inserções, visualizados em gel de agarose, são denominados marcadores de RAPDs. Estes marcadores são dominantes, pois são identificados com a presença de um fragmento específico de DNA amplificado de um genótipo comparada com a ausência do mesmo fragmento de outro genótipo (presença versus ausência de bandas), os quais são herdados de forma mendeliana (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Dentre as vantagens do uso de RAPD quando comparado a outros métodos pode-se citar: grupos universais de primers podem ser usados na análise genômica de uma ampla variedade de espécies; não há necessidade de trabalho preliminar como isolamento de sonda de DNA clonado, preparação de filtros para hibridização ou sequenciamento de nucleotídeos e cada marcador de RAPD é equivalente a uma seqüência de sitio alvo (WILLIAMS et al., 1990). Entretanto deve-se tomar cuidado para se obter resultados reprodutíveis (BJORKROTH; RIDELL; KORKEALA, 1996).

Reações de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) e reação de polimerase em cadeia (PCR) são técnicas que têm sido empregadas com sucesso para identificar muitos microrganismos até o nível de estirpe. Em lactobacilos esta técnica é empregada para distinção principalmente entre espécies de *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* e *L. johnsonii* (KHALED et al., 1997).

Pesquisas que viabilizem a identificação de bactérias lácticas (BAL) tornam-se necessárias devido a diversidade de aplicação tecnológica de tais bactérias, principalmente os lactobacilos. Segundo Quere, Deschamps e Uraci (1997) a identificação precisa de bactérias é ambígua e complicada quando se utilizam métodos fenotípicos como fermentação de carboidratos, devido ao aumento no número de espécies de BAL que variam nestes caracteres.

Reuter, Kelin e Goldberg (2002), estudando *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* nos últimos 30 anos, compararam bactérias pertencentes aos grupos *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. reuteri* /*L. fermentum* provenientes de alimentos e de produtos farmacêuticos com espécies obtidas de banco de culturas. Os autores observaram que os critérios fenotípicos permitiram

identificação do gênero e, na maioria dos casos, identificação correta das espécies. Entretanto, resultados contraditórios foram observados e para confirmar identificações duvidosas ou caracterizar cepas dentro das espécies, RADP foi considerado um método eficiente.

Torriane et al. (2001) avaliaram 30 cepas de lactobacilos utilizando nove primers e verificaram que RAPD e RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) foram métodos eficientes em discriminar espécies fenotipicamente relacionadas como *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus*, pois métodos para identificação e caracterização de cepas pertencentes ao grupo de *L. plantarum* são de grande interesse na indústria de alimentos e outros campos da microbiologia. Todas as cepas testadas, com exceção de uma delas, foram agrupadas segundo suas espécies. Para a diferenciação de espécie, houve concordância entre estas metodologias, indicando que ambas mostraram ser poderosas e seguras, permitindo a distribuição de novos isolados destas espécies. Quando estudadas para caracterização intra-específica, ambas metodologias permitiram distinguir a maioria das cepas estudadas.

Devido ao fato de que os lactobacilos isolados do trato gastrointestinal não mostrarem freqüentemente conformidade com a classificação taxonômica baseada em caracteres fisiológicos e bioquímicos, alternativas para se caracterizar cepas de lactobacilos de tal origem tornam-se necessárias (KHALED et al., 1997). Desta forma, a tecnologia de RAPD foi utilizada neste estudo para diferenciar a heterogeneidade genética entre os lactobacilos provenientes do trato gastrointestinal humano.

O objetivo do presente trabalho foi isolar lactobacilos de fezes humanas e identificá-los por meio de métodos bioquímicos e moleculares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, ambos da Universidade Estadual de Londrina.

Microrganismos:

Os isolados foram obtidos de fezes de crianças de ambos os sexos, com até um ano de idade, durante os meses de novembro e dezembro de 2004 da creche da Universidade Estadual de Londrina.

Isolamento de *Lactobacillus ssp*

Foram coletadas amostras de fezes de seis crianças utilizando a técnica de swab (KONEMAN et al, 1997). O swab foi colocado em 10 ml de caldo Rogosa (LBS) e incubado a 37°C por 24 horas. Para o isolamento foi utilizado o ágar MRS (de Man, Rogosa e Sharpe, 1960), pH 5,4 adicionado de acetato (1,5%) e púrpura de bromocresol (0,045%) com incubação a 37°C (LABORATÓRIO, 1981).

As colônias que mostraram características típicas de *Lactobacillus ssp*, foram transferidas com alça de platina para tubos contendo caldo MRS (37°C por 24 horas). Após turvação do meio os isolados foram submetidos ao teste de coloração de Gram e de esporos e ao teste de catalase. (HARRIGAN e MCCANCE, 1976). A produção de catalase foi verificada pela adição de uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% em uma lâmina onde misturou-se o inóculo, observando-se a efervescência. As colônias Gram positivas em forma de bastonetes e catalase negativas foram cultivadas em caldo MRS modificado (contendo 5% de glicose e isento de extrato de carne) e incubadas a 37°C, por 24 horas, em tubos de cultura contendo um tubo de Durhan invertidos, para verificar a produção de gás. Na coloração de esporos utilizou-se o corante verde malaquita.

A capacidade dos isolados crescerem em diferentes temperaturas foi avaliada, utilizando-se culturas ativas inoculadas na proporção de 1% em tubos contendo 5 ml de LDR (Leite Desnatado Reconstituído) à 10% e incubadas a 15°C por 3 e 10 dias, a 37°C

por dois dias e 45°C por três dias. O crescimento foi observado pela formação do coágulo no leite no tempo indicado.

Verificou-se a capacidade das culturas em fermentar vários carboidratos, sendo o caldo MRS modificado, omitindo-se o extrato de carne e adicionado-se 2% do carboidrato teste (dextrose, frutose, galactose, lactose, maltose, manose, ramnose, sacarose, sorbitol e xilose). Os carboidratos foram esterilizados separadamente do meio, sendo as soluções vaporizadas por 20 minutos durante três dias consecutivos. Como indicador utilizou-se 0,004% de púrpura de bromocresol. Após inoculação das culturas com alça de platina, os tubos foram incubados a 37°C por 48 horas. A leitura foi interpretada pela mudança da coloração do indicador de azul para amarelo, o que indicava resultado positivo (DAVIS, 1955).

Análise de variabilidade genética

Linhagens de *Lactobacillus* usadas na análise de RAPD

As linhagens de lactobacilos utilizadas para fins comparativos, consideradas como padrões, foram obtidas do Banco de Culturas (ver detalhes no anexo, com os respectivos códigos) do Ital (Instituto de Tecnologia de Alimentos- Campinas SP) e são provenientes do Banco de Culturas da Coréia: *Lactobacillus acidophilus* (KCTC 3111), *Lactobacillus casei* (KCTC 1121), *Lactobacillus rhamnosus* (KCTC 3237/ ATCC 7469), *Lactobacillus johnsoni* (KCTC 3138/ ATCC 332), e *Lactobacillus paracasei* (KCTC 3510); da Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz -RJ): *Lactobacillus brevis* (00221/ATCC 367), *Lactobacillus fermentum* (00225/ATCC 9338) e *Lactobacillus plantarum* (00007/ ATCC 8014) e cedidas pela Christian Hansen: *Lactobacillus acidophilus* (La-5TM) e *Lactobacillus casei* (Lc-01TM), em envelopes de cultura comercial probiótica liofilizada e Danisco: *Lactobacillus helveticus*. Todas as linhagens utilizadas, com exceção das cepas da Chr. Hansen que eram liofilizadas, foram repicadas e mantidas em caldo MRS e armazenadas a -20°C, para serem posteriormente descongeladas e reativadas.

Isolamento de DNA

O DNA proveniente de isolados de *Lactobacillus ssp* foi extraído de acordo com a metodologia de Luchansky, Tennant e Klaenhammer (1991) modificada. Após três

ativações consecutivas os isolados foram inoculados em 100 ml de caldo MRS por 24 horas. Após a centrifugação por 10 minutos a 5000 rpm e duas lavagens em solução tampão TES (50 mM NaCl, 30 mM Tris, pH 8,0 e 5mM de EDTA), as células foram ressuspensas em 0,5 ml de tampão de lise (50 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, 20% de sacarose) contendo 4,0 µg/ml de mutanolisina, 20 µg/ml de lisozima e RNase (44µl/18 ml de tampão). As amostras foram incubadas à 37°C por 45 minutos.

As amostras foram então tratadas com 200 µl de SDS 20% incubadas à 65°C, até tornarem-se claras e menos viscosas (\pm 2 horas). Após homogeneização em vortex, foi adicionado 20µl/amostra de proteinase K, seguida de outra homogeneização e incubação a 65°C por 15 minutos. As amostras foram tratadas com extração por fenol-clorofórmio: fenol (700µl/amostra) por duas vezes e clorofórmio (500µl/amostra). O DNA foi precipitado em etanol (95 e 70%), seguido da adição de álcool 70%. As amostras permaneceram em estufa a 37°C por \pm 1 hora. Posteriormente adicionou-se 250µl/ de tampão TE (10mM Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA), sendo o DNA mantido a 37°C por uma noite.

Quantificação do DNA

Para a quantificação do DNA dos isolados, foi feita a análise comparativa das amostras coradas com brometo de etídio em géis de agarose. A técnica consiste na utilização de uma seqüência ascendente de concentrações de solução-padrão de DNA pipetadas lado a lado em gel de agarose, sendo utilizado neste experimento as concentrações de 2,5 ng; 5,0 ng; 10 ng e 15 ng , à qual se comparou a uma amostra de concentração desconhecida de DNA, neste caso, as amostras de DNA dos isolados. A observação da imagem digitalizada do mesmo gel, proporcionou uma estimativa aproximada da concentração de DNA das soluções testadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Primers testados

As seqüências de DNA foram amplificadas com primers produzidos pela Operon Technologies, Alameda, USA. Os primers testados foram: W5, X4, W2, W4, W20, W11, W19, X3, X5, X9, X13, X14, X12, W14, W6, X9, sendo que nos seis últimos obtiveram-se os melhores resultados de amplificação. Nas reações de amplificação, o volume total foi de 10µl e os reagentes estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Reagentes do coquetel para amplificação do DNA (quantidade para uma reação).

Reagentes	Volume (μ l)
Água “ Milli-Q” esterilizada	5,3 μ l
Tampão 10x	1,0 μ l
MgCl ₂ (1,5mM)	0,5 μ l
DNTPs (0,4 mM de cada nucleotídeo)	1,0 μ l
Primer (10pmol)	1,0 μ l
Taq DNA polimerase (1U)	0,2 μ l

Amplificação do DNA (RAPD)

Para amplificação do DNA utilizou-se o termociclador , sendo cada reação submetida a 40 ciclos após desnaturação inicial a 92°C de 3 minutos. Cada ciclo se constituiu de 40 segundos a 92°C, 1 minuto de 30 segundos a 40°C e 2 minutos a 72°C. Os ciclos foram seguidos de uma extensão final de 5 minutos a 72°C e 10 minutos a 10°C (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Análise de Polimorfismo

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% , utilizando tampão de corrida TBE (Tris base, ácido bórico, EDTA 0,5M pH 8,0), 2 μ l de tampão de carregamento e corados por brometo de etídio. O tempo de corrida eletroforética foi de três horas a uma tensão de 70V. Os fragmentos amplificados e separados por eletroforese foram comparados com aqueles do DNA de tamanho molecular conhecido, (“1 Kb Plus DNA Ladder”), evidenciados sob luz UV (SAMBROOK et al., 1989) e documentados em um fotodocumentador. Cada isolado foi analisado quanto à presença e ausência de produtos de amplificação.

Análise Estatística

A análise de RAPD foi determinada por comparação dos perfis eletroforéticos do DNA amplificado dos indivíduos analisados, com cada um dos primers. Os

dados obtidos por amplificação ao acaso de DNA (RAPD) foram analisados pelo programa computacional NTSYS. PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (ROHLF, 1987). Os dados introduzidos na forma de variáveis binárias, ou seja, o número 1 significa a presença de banda e o número 0 a ausência. Desta forma, o programa construiu uma matriz de similaridade utilizando-se o coeficiente de Jaccard (SNEATH; SOKAL, 1973). O valor do coeficiente de similaridade (J) foi calculado pela fórmula: $J = a / a + b + c$, onde “a” corresponde ao número de concordâncias positivas e, “b” e “c” correspondem ao número de discordâncias. Os dados da matriz de similaridade foram então utilizados pelo programa para construção do dendograma pelo método UPGMA “Unweighted Pair-Group Method With Arithmetical Averages”.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento de *Lactobacillus* ssp

As 75 colônias isoladas apresentaram-se como Gram positivas, sendo a maioria bacilos (cocobacilos, bacilos longos e finos) e raramente cocos. A predominância de bastonetes Gram positivos confirmou a eficácia do meio de cultura utilizado, o LBS. Foram pré-selecionados 30 isolados, cuja morfologia era de bacilos isolados ou em fileiras, catalase negativos, não produziram gás em caldo MRS modificado e que não produziam esporos.

Na Figura 1 pode-se observar o isolado L25 que apresenta como característica morfológica a presença de bastonetes longos.

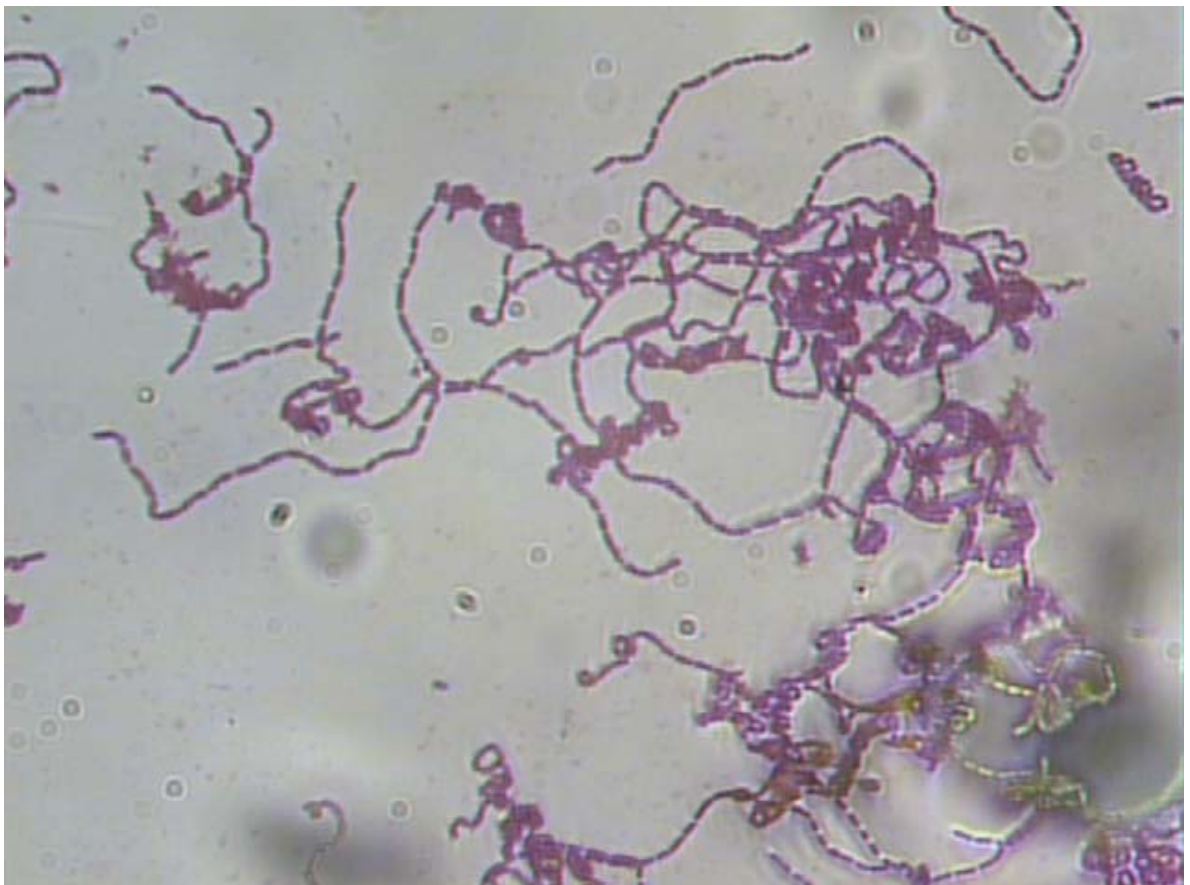


Figura 1: Foto da coloração de Gram do isolado L25.

Estes isolados foram submetidos aos testes bioquímicos de identificação. No teste de fermentação de carboidratos (Tabela 2) observaram-se variações nas capacidades fermentativas dos isolados.

Tabela 2: Fermentação de carboidratos para caracterização dos isolados de lactobacilos.

Isolados	Dextros e	Frutose	Galactos e	Lactose	Maltose	Manose	Ramnos e	Sacarose	Sorbitol	Xilose
L1	+	+	+	()	+	+	()	()	+	-
L2	+	+	+	+	+	+	()	+	-	-
L3	+	+	+	+	+	+	()	+	-	-
L4	+	+	+	+	+	+	()	+	-	-
L5	+	+	+	+	+	+	()	+	-	-
L6	+	+	+	+	+	+	()	+	-	-
L7	+	+	+	+	+	+	()	+	-	-
L8	+	+	+	+	+	+	()	+	-	-
L9	+	+	+	+	+	+	()	+	-	-
L10	+	+	+	+	+	+	()	+	-	-
L11	+	+	+	+	+	+	()	+	#	-
L12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L13	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L14	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L15	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L16	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
L17	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
L18	+	+	+	+	+	+	-	#	#	-
L19	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
L20	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
L21	+	+	+	+	+	+	#	+	+	#
L22	+	+	+	+	+	+	#	+	+	#
L23	+	+	+	+	+	()	#	+	+	-
L24	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
L25	+	+	+	#	+	+	#	+	+	-
L26	+	+	+	()	+	+	()	+	+	-
L27	+	+	()	()	+	+	()	+	+	-
L28	+	+	+	+	+	+	()	+	+	-
L29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	()
L30	+	+	+	+	+	+	()	+	+	-

+ = reação positiva

- = reação negativa

() = reação lenta

= fraca

Os resultados de crescimento em diferentes temperaturas de incubação estão na Tabela 3. Os isolados L4 e L5 cresceram a 37°C e 45°C, porém não a 15°C. Estes resultados estão compatíveis com os critérios estabelecidos inicialmente por Orla Jensen (1919) e posteriormente por Sharpe (1962) e Manual de Bergey (1986). O não crescimento a 15°C constitui o critério mais útil para classificação de *L. acidophilus*, enquanto que o crescimento a 45°C não permite tal diferenciação. Entretanto, espécies de lactobacilos isoladas de fezes, como *L. casei*, *L. brevis* e *L. plantarum* crescem a 15°C.

Tabela 3: Crescimento dos isolados em leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% em diferentes temperaturas de incubação.

Isolado	37°C/ 48 horas	45°C/3 dias	15°C/ 3 dias	15°C/15 dias
L4	+	+	-	-
L5	+	+	-	-
L12	+	+	-	*
L19	+	-	-	*
L20	+	-	-	*
L22	+	-	-	*
L23	+	-	-	*
L24	+	-	-	*

* coágulo fraco

Xanthopoulos et al. (2000) avaliaram o crescimento de lactobacilos em LDR 10% incubados a 30°, 37° e 40° C por 24 horas e verificaram melhor crescimento dos isolados a 37° e 40°C, sendo que o pH do leite foi menor do que 5,0 para a maioria das culturas, sendo considerado uma importante característica para a produção de leite fermentado.

De acordo com a Tabela de Identificação do API e Manual de Bergey (1986), os isolados poderiam ser correspondentes às bactérias descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Identificação provável dos isolados segundo a Tabela de Identificação API e Manual de Bergey (1986).

Isolado	Espécie provável	Isolado	Espécie provável
L1	<i>L. gasseri</i>	L16	<i>L.reuteri/L. fermentum</i>
L2	<i>L. fermentum</i>	L17	<i>L.reuteri/L. fermentum</i>
L3	<i>L. fermentum</i>	L18	Nd
L4	<i>L. acidophilus</i>	L19	<i>L. casei/L. plantarum</i>
L5	<i>L. acidophilus</i>	L20	<i>L. casei/L. plantarum</i>
L6	<i>L.reuteri</i>	L21	<i>L. plantarum</i>
L7	<i>L.reuteri</i>	L22	<i>L. plantarum/ L. paracasei</i>
L8	<i>L.reuteri</i>	L23*	<i>L. brevis</i>
L9	<i>L.reuteri</i>	L24	<i>L. salivarius/ L. plantarum/ L. casei</i>
L10	<i>L.reuteri</i>	L25	<i>L. casei</i>
L11	<i>L.reuteri</i>	L26	<i>L. casei</i>
L12	<i>L casei</i>	L27	<i>L. brevis</i>
L13	<i>L.reuteri/ L casei</i>	L28	<i>L. acidophilus /L. salivarius</i>
L14	<i>L.reuteri/ L casei</i>	L29	<i>L. rhamnosus/ L. salivarius</i>
L15	<i>L.reuteri/ L casei</i>	L30	<i>L. salivarius/L. acidophilus</i>

Nd: não determinado; * porém sorbitol +

Em função dos resultados apresentados nas Tabelas 3 e 4, podemos concluir que os isolados selecionados apresentaram diferenças no perfil bioquímico e no comportamento frente às temperaturas de crescimento. Pela interpretação dos resultados de assimilação de carboidratos (Tabela 2) e aplicando-se a Tabelas de Identificação do API e do Manual de Bergey, os isolados poderiam ser pertencentes às espécies *L.reuteri*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. brevis* e *L. paracasei*. Em relação à temperatura de crescimento (Tabela 3) os isolados L4 e L5 poderiam pertencer ao grupo *L. acidophilus*.

Análise de variabilidade genética

Na análise de marcadores RAPD, a técnica demonstrou a existência de diferenças genéticas entre os isolados. Dentre os 16 primers utilizados, seis (OPW 14 e 16, OPX 9, 12, 13 e 14) proporcionaram eficiência na amplificação das amostras, gerando um total de 110 bandas polimórficas, demonstrando 100% de polimorfismo. Os primers selecionados geraram um número apreciável de bandas, onde apenas as bandas mais intensas foram analisadas.

As bandas geradas foram analisadas e uma matriz correspondente à distribuição das mesmas foi construída como descrito em Material e Métodos. Estas bandas foram utilizadas para a construção de uma matriz de similaridade representada na Tabela 5. A partir dos valores de similaridade genética obteve-se um filograma utilizando-se o algoritmo UPGMA como metodologia de agrupamento.

Tabela 5: Dados de similaridade genética entre os isolados.

Isolado	Lp	Lai	Lac	Lb	Lr	Lh	Lf	Lcc	Lci	Lpl	Lj
L2	0,21276	0,13043	0,15217	0,08000	0,26190	0,15384	0,15384	0,30434	0,30232	0,18750	0,20454
L22	0,24074	0,12727	0,14545	0,18518	0,14545	0,12903	0,25000	0,14754	0,22222	0,19642	0,18867
L1	0,18000	0,17391	0,14583	0,14285	0,14583	0,14814	0,24000	0,24000	0,18367	0,07272	0,14583
L3	0,22917	0,12500	0,19565	0,07692	0,27906	0,19231	0,19231	0,31914	0,28889	0,20408	0,19565
L4	0,22222	0,13636	0,13333	0,06122	0,30769	0,18367	0,13725	0,28888	0,22727	0,17021	0,21428
L5	0,18750	0,13043	0,17777	0,05882	0,26190	0,20000	0,15384	0,33333	0,27272	0,21276	0,20454
L8	0,18750	0,13043	0,17777	0,05882	0,26190	0,20000	0,15384	0,33333	0,27272	0,21276	0,20454
L6	0,18750	0,13043	0,17777	0,05882	0,26190	0,20000	0,15384	0,33333	0,27272	0,21276	0,20454
L7	0,18750	0,13043	0,17777	0,05882	0,26190	0,20000	0,15384	0,33333	0,27272	0,21276	0,20454
L9	0,18750	0,15550	0,17777	0,08000	0,29268	0,20000	0,15384	0,33333	0,27272	0,18750	0,23355
L10	0,11111	0,09756	0,12195	0,02173	0,17948	0,10417	0,12765	0,23255	0,22500	0,16279	0,15000
L11	0,22727	0,19512	0,11111	0,08510	0,31578	0,23913	0,14000	0,29545	0,23255	0,17391	0,25000
L12	0,20930	0,17500	0,06667	0,06521	0,20000	0,14583	0,10000	0,22222	0,18604	0,15556	0,09090
L13	0,17777	0,17073	0,06521	0,06382	0,19512	0,16666	0,07690	0,24444	0,18181	0,20454	0,13953
L14	0,20930	0,14634	0,06667	0,08880	0,23077	0,12244	0,10000	0,22222	0,21428	0,15556	0,09090
L15	0,17777	0,14285	0,06522	0,06382	0,22500	0,16667	0,05660	0,21739	0,18181	0,20454	0,11363
L18	0,18000	0,17391	0,2222	0,19148	0,22222	0,16981	0,26530	0,34782	0,23404	0,22916	0,17021
L17	0,17647	0,17021	0,19149	0,21276	0,24444	0,23529	0,23529	0,18867	0,18000	0,17647	0,12000
L19	0,14583	0,11111	0,18604	0,01960	0,10869	0,11538	0,16000	0,20833	0,17391	0,17021	0,13333
L20	0,11111	0,12500	0,17948	0,02173	0,12195	0,10417	0,08163	0,20454	0,13953	0,13636	0,15000
L21	0,20402	0,17391	0,12245	0,14285	0,19565	0,16981	0,19231	0,29166	0,11538	0,15686	0,17021
L23	0,08620	0,09430	0,15686	0,15384	0,15686	0,13793	0,11864	0,15789	0,19230	0,18867	0,22916
L24	0,11864	0,12962	0,21568	0,16666	0,16981	0,15000	0,16949	0,16949	0,16071	0,17857	0,21568
L25	0,20000	0,17021	0,19148	0,16326	0,14285	0,18867	0,23529	0,28571	0,13461	0,17647	0,19148
L28	0,20833	0,15217	0,14893	0,10000	0,10204	0,19607	0,24489	0,15094	0,14000	0,18367	0,08000
L26	0,22641	0,13207	0,19607	0,24000	0,17307	0,25925	0,17241	0,19298	0,12280	0,20370	0,19607
L27	0,07273	0,05882	0,14583	0,12000	0,10000	0,12727	0,08771	0,12727	0,09434	0,20408	0,17021
L29	0,27083	0,14285	0,14000	0,26086	0,18750	0,20754	0,16363	0,12280	0,13207	0,15094	0,14000
L30	0,13953	0,15789	0,07143	0,24324	0,12500	0,18181	0,18181	0,13043	0,11627	0,19512	0,15384
Lai			0,17500								
Lci								0,34883			

Lp (*L. paracasei*), Lai (*L. acidophilus*), Lac (*L. acidophilus*), Lb (*L. brevis*), Lr (*L. reuteri*), Lh (*L. helveticus*), Lf (*L. fermentum*), Lcc (*L. casei*) Lci (*L. casei*), Lpl (*L. plantarum*) e Lj (*L. johnsoni*).

A porcentagem de similaridade entre as cepas padrões da Chr. Hansen e ITAL de *L. acidophilus* foi considerada baixa, sendo de 17,5% e entre os padrões de *L. casei* foi de 34,8%.

Sánchez et al. (2006) avaliaram 136 estirpes de lactobacilos isolados de queijos através de RAPD e verificaram similaridade de 60,65% entre as cepas de *L. plantarum*, evidenciando alta diversidade genética, considerando-as selvagens. A diversidade genética de *L. paracasei* subsp. *paracasei* foi demonstrada não somente pelo número de genótipos obtidos como também pelo baixo nível de similaridade. Os autores também constataram a separação de dois padrões de *L. curvatus* em dois clusters diferentes.

A metodologia de RAPD para caracterização de cepas de lactobacilos isoladas do trato intestinal humano é considerada uma alternativa complementar aos métodos tradicionais de sistemática, sendo encontrada, neste experimento, uma boa correlação em ambas metodologias pois o dendrograma obtido (Figura 2) demonstrou a separação clara de

quatro grupos distintos, sendo um deles formado pelas espécies padrão *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* (ITAL), *L. casei* (Chr. Hansen- Lc 01TM), *L. rhamnosus* e *L. casei* (ITAL), possuindo características comuns, pois possivelmente algumas cepas foram selecionadas para serem metabolicamente ativas no trato gastrointestinal. Estes resultados evidenciaram que RAPD foi capaz de diferenciar diversas espécies de lactobacilos, pois apresentaram baixa similaridade, apesar dos dois padrões de *L. casei* estarem neste mesmo cluster.

O outro grupo, apresentando baixa variabilidade, foi formado pelos isolados L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14 e L15. Estes resultados estão de acordo com a Tabela 4 de identificação bioquímica, pois alguns destes isolados seriam da mesma espécie (*L. reuteri*), sendo os isolados L5, L6 e L8 100% similares, embora L5 tenha sido anteriormente classificado *L. acidophilus*. No terceiro grupo pode-se observar claramente que alguns isolados como L22, L23, L24, L27, L19 e L20 estão todos dentro do mesmo cluster com similaridade em torno de 27%, sendo que alguns destes isolados foram posteriormente selecionados (capítulos 2 e 3), pois possuem em comum, a tolerância aos sais biliares, condições ácidas e ao fenol. O quarto grupo, contendo os padrões *L. fermentum*, *L. acidophilus* (Chr. Hansen – La-5TM) e *L. helveticus* apresentaram também alto polimorfismo.

A Figura 3 mostra o eletroforograma, onde observa-se um grande número de bandas polimórficas, provenientes da amplificação com o primer X9.

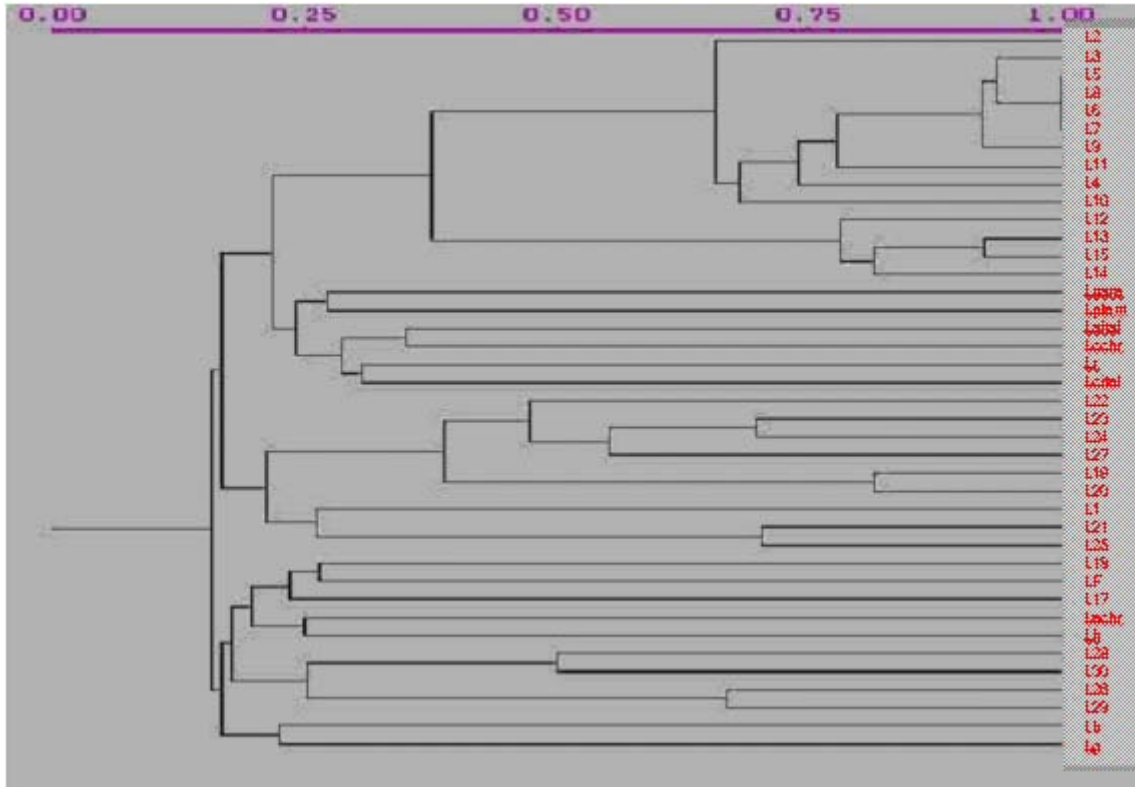


Figura 2: Dendrograma de similaridade genética obtido empregando-se coeficiente de Jaccard e método UPGMA para os isolados de lactobacilos, utilizando os dados obtidos pela técnica de RAPD. Seqüência: L2, L3, L5, L8, L6, L7, L9, L11, L4, L10, L12, L13, L15, L14, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* Ital, *L. casei* (Chr. Hansen- Lc 01TM), *L. reuteri*, *L. casei*- ITAL, L22, L23, L24, L27, L19, L20, L1, L21, L25, L18, *L. fermentum*, L17, *L. acidophilus* (Chr. Hansen- La -5TM), *L. helveticus*, L28, L30, L26, L29, *L. brevis* e *L. johnsoni*.

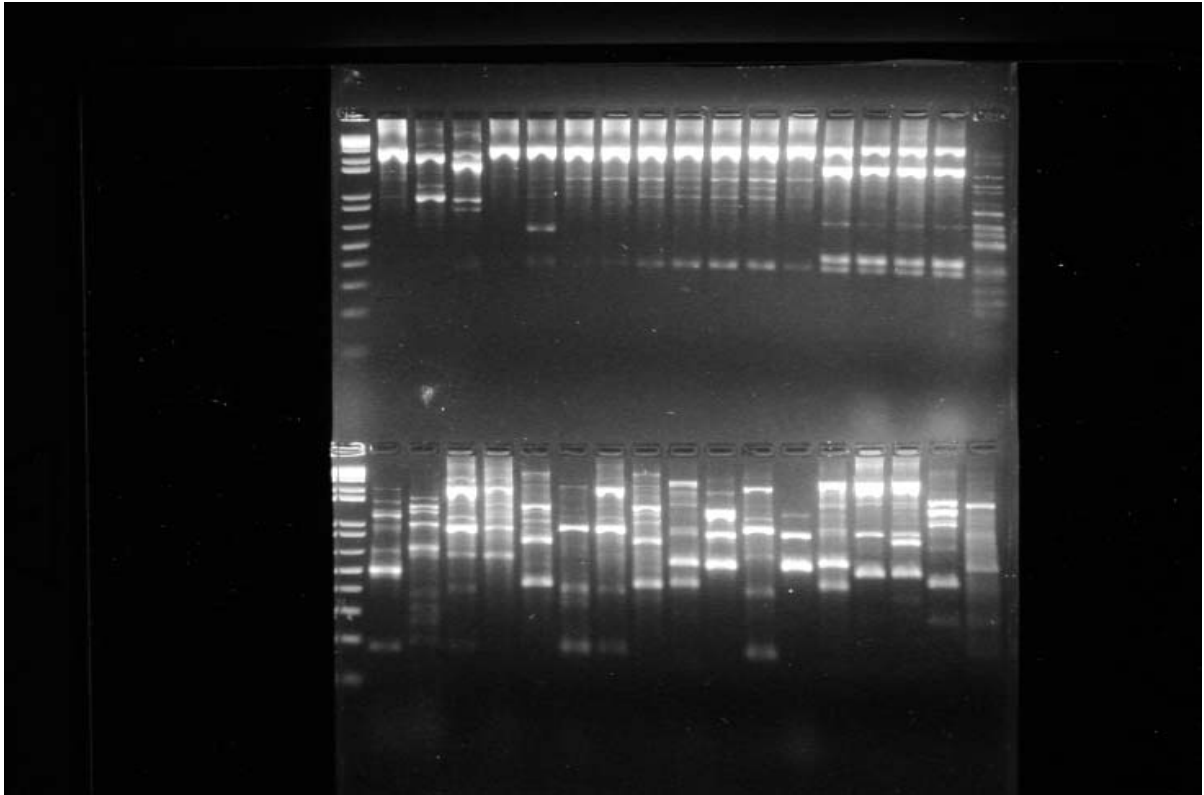


Figura 3: Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso – RAPD de 33 isolados de *Lactobacillus ssp* empregando o primer X9 , linha 2 a 36. Isolados L2, L22, L1, L3, L4, L5, L8, L6, L7, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15, controle, 1 Kb, L18, L17, L19, L20, L21, L23, L24, L25, L28, L26, L27, L29, L30, *L. paracasei*, *L. acidophilus* (ITAL), *L. acidophilus* (Chr.Hansen La-5TM), *L. brevis*. O padrão de massa molecular (linha 1 e 19) 100 pb ladder (Invitrogen Life Technologies. Eletroforese em gel de agarose a 2% corada com brometo de etídio).

Nigatu et al. (2001) testaram um total de 41 cepas de lactobacilos, incluindo àquelas consideradas referências, e verificaram que todas as cepas de *L. plantarum* foram claramente discriminadas a 72% de similaridade através de RAPD. As subespécies de *L. casei* também foram agrupadas separadamente e parecem ter mais bandas em comum com o mesmo peso molecular com cepas de outras espécies do que entre elas. Os resultados deste estudo mostraram que o procedimento de RAPD é capaz de separar espécies distintas e relacionadas em vários níveis de similaridade.

Khaled et al. (1997) avaliaram 88 cepas de lactobacilos através de RAPD isoladas de bancos de cultura e algumas delas provenientes do trato gastrointestinal de ratos e verificaram que algumas cepas eram similares a *L. salivarius*, *L. brevis* e *L. fermentum*. Os autores constataram também grandes distâncias genéticas entre as cepas de *L. acidophilus* .

Klein et al. (1998) identificaram lactobacilos isolados de humanos, aves e bovinos e constataram que esta metodologia é adequada para diferenciação entre espécies do grupo *acidophilus* (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsoni* e *L. amylovorus*), pois cada espécie apresentou um padrão específico de banda.

Ahrné et al. (2006) identificaram lactobacilos provenientes de fezes de crianças com uma, duas, quatro e oito semanas de idade e aos 6, 12 e 18 meses através de RAPD. Os autores consideraram que quando os isolados da mesma criança mostravam o mesmo perfil de bandas na análise de RAPD, estes eram considerados pertencentes a mesma espécie. Foram identificadas as seguintes espécies de lactobacilos: *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* e *L. salivarius*.

Martín, Langa e Riviriego (2003) isolaram bactérias lácticas do leite materno e pele de oito mães voluntárias e também das fezes e cavidade oral dos bebês e verificaram um mesmo perfil entre os isolados dentro de cada par (mãe e bebê) através de RAPD nos três primers testados, sendo identificados como *L. gasseri*. As demais bactérias em forma de bastonetes com perfil diferente de bandas foram identificadas como *L. fermentum*.

Dal Bello e Hertel (2006) compararam a presença de espécies de lactobacilos nas fezes e cavidade oral de humanos através de RAPD e constataram que a composição das espécies era característica cada indivíduo e que algumas espécies idênticas ocorriam em ambos habitats como *L. gasseri*, *L. sakei*, *L. vaginalis* e grupo *L. casei* exibindo o mesmo perfil de RAPD. Verificaram também que cepas da mesma espécie isoladas de diferentes indivíduos mostraram diferentes perfis de RAPD. Os autores concluíram que RAPD foi considerada uma técnica apropriada para tipificação molecular de lactobacilos do grupo *L. acidophilus* além de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*.

Drake et al. (1996) utilizaram um único primer para diferenciar 16 cepas de *L. helveticus*. Devido ao fato de tratar-se de bactérias da mesma espécie, algumas bandas similares foram observadas em todas as linhas. Os autores ressaltaram que a identificação e purificação das bandas consideradas únicas dentro de cada amostra, poderia ser usado para identificação direta de cada estirpe. Primers específicos poderiam ser gerados para amplificar as bandas únicas ou uso de marcadores em cada estirpe.

Richard et al. (2001) compararam através de semi-RADP, método que utiliza dois primers consistindo parte do gene que codifica a enzima malolática (específica para identificação de bactérias lácticas) e ainda também uma seqüência arbitrária; cepas de *L. rhamnosus* isoladas de saliva de crianças com cepas consideradas referência (banco de

culturas ATCC). Foram encontrados diferentes perfis dentro das cepas estudadas gerando padrões genômicos adequados para caracterização de espécies.

Por outro lado, Nishitani et al. (2004) avaliaram por meio de RAPD 45 lactobacilos isolados de fezes humanas e de produtos fermentados e verificaram resultados conflitantes quando confrontados com identificação por PCR quando tratavam-se de espécies relacionadas com *L. plantarum* como *L. paraplantarum* e *L. pentosus*. Os autores agruparam estes isolados em 4 clusters A, B, C e D e constataram além da baixa similaridade entre eles, que era de 40%, estes clusters não eram espécie específico. Entretanto, 10 dos 14 isolados de humanos foram incluídos no mesmo cluster e oito isolados mostravam baixa similaridade com qualquer um dos demais clusters, concluindo que RAPD é uma ferramenta útil para distinguir espécies relacionadas de lactobacilos.

4 CONCLUSÃO

Os isolados foram agrupados em quatro clusters, sendo que em um deles, formado pelas cepas L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14 e L15, verificou-se alta similaridade havendo correlação com os dados bioquímicos. Os isolados padrões também apresentaram alto polimorfismo.

REFERÊNCIAS

- AHRNÉ, S.; LONNERMARK, E.; WOLD, A.E.; ABERG, N.; HESSELMAR, B.; SAAALMAN, R.; STRANNEGARD, I.; MOLIN, G.; ADLERBERTH, I. *Lactobacilli* in the intestinal microbiota in Swedish infants. **Microbes and Infection**, Paris, 2006. (no prelo).
- ASHENAFI, M.; BUSSE, M. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* on *Salmonella infantis*, *Enterobacter aerogens* and *Escherichia coli* during Tempeh fermentation. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 52, p. 169–172, 1989.
- BERGEY, D.H.; SNEATH, P.H.A.; MAIN, S.N.; SHARPE, M.E.; HOLT J.G. **Bergey's Manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1986. 1599 p.
- BJORKROTH, J., RIDELL, J.; KORKEALA, H. Characterization of *Lactobacillus sake* strains associating in production of ropy slime by randomly polymorphic DNA (RAPD) and pulsed-field electroforesis (PFGE). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 31, p.59-68, 1996.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, p.759-768, 1998.
- CEBICI, A.; GÜRAKAN, C. Properties of potencial probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **Food Microbiology**, London, v. 20, p.511-518, 2003.
- DAL BELLO, F.; HERTEL, C. Oral cavity as natural reservoir for intestinal Lactobacilli. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, 2006.(no prelo).
- DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **J. Applied Bacteriology**, Oxford, v. 23, nº 1, p. 130-135, 1960.
- DAVIS, G.H. The classification of lactobacilli from the human mouth. **Journal of General Microbiology**, London, v.13, p.481-93, 1955.
- DRAKE, M.A.; SMALL, C.L.; SPENCE, K.D.; SWANSON, B.G. Differentiation of *Lactobacillus helveticus* using molecular typing methods. **Food Research International**, Barking, GB, v. 29, n: 5-6, p. 451-456, 1996.

ERKKILA, S.; PETAJA, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, Barking, GB, v.55, p. 297-300, 2000.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.

FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GLENN, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, GB, v.9, n.1, p.53-61, 1999.

GIBSON, G.R.; WILLIAMS, C.M. Gut fermentation and health advantages: myth or reality? **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.81, p.83-94, 1999.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, X. *Bifidobacterium ssp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.10, p.139-157, 1999.

HAVENAAR, R.; HUIS IN 'T VELD, J.H.J. Probiotics; a general review In: Wood, B. (Ed) **The Lactic acid Bacteria in Health and Disease**. Barking:Elsevier, 1992. 151-170.

HARRIGAN, W.F.; McCANCE, M.E. **Laboratory methods in food and dairy microbiology**. London:Academic Press, 1976. 452p.

JOHANSSON, M.L.; MOLIN, G.; JEPPSSON, B. Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: In vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 15-20, 1993.

KLAENMHEMMER, T.R. Functional activities of lactobacillus probiotics: genetic mandate. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, p.497-505, 1998.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, p.103-125, 1998.

KHALED, A.D.D.; NEILAN, B.A.; HERIKSSON, A.; CONWAY, P.L. Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 153, p. 191-197, 1997.

KONEMAN, E.; ALLENS, S.; DOWELL, V. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5. ed. Nova York: Lippincott, 1997. 321 p.

LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL. **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus ingredientes**. Brasília, 1981. v. 1.

LUCHANSKY, J. B.; TENNANT, M. C.; KLAENHAMMER, T. R. Molecular cloning and DNA polymorphisms in *Lactobacillus acidophilus* and *L. gasseri*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill, v. 74, p. 3293-3302, 1991.

MACFARLANE, G.T.; ALLISON, C.; GIBSON, S.A.W. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 67, p.525-527, 1988.

MACFARLANE, G.T.; MACFARLANE, S. Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**., Oslo, v. 222 (Suppl.), p.3-9,1997.

MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **British Medical Journal**, London, v. 318, p.999-1003. 1999.

MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 69 (suppl), p.1035s-1045s, 1999.

MARTÍN, R.; LANGA, S.; REVIRIEGO, C. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **Journal of Pediatrics**, Sait Louis, Mo, v. 143, p.754-758, 2003.

MULLINS, K.B; FERRE F.; GIBBS; R.A. **The polymerase chain reaction (Hardcover)**. New York:Springer-Verlag, 1994, 550p.

NIGATU, A.; ARHNÉ, S.; MOLIN, G. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for the distinction of *Lactobacillus* species. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 79, p.1-6, 2001.

NISHITANI, Y.; SASAKI, E.; FUJISAWA, T.; OSAWA, R. Genotypic analyses of *Lactobacilli* with a range of tannase activities isolated from human feces and fermented food. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 109-117, 2004.

ORLA JENSEN, S. La classification des bacteries lactiques. **Les Ulis**, Fr, v. 4, p.468-47, 1919.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotics story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, p.4-8. 1974.

QUERE, F.; DESCHAMPS, A.; URDACI, M.C. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, p. 783-790, 1997.

REUTER, G.; KELIN, G.; GOLDBERG, M. Identification of probiotic cultures in food samples. **Food Research International**, Barking, v. 35, p. 117-124, 2002.

RICHARD, B.; GROISILLIER, A.; BADET, C.; DORIGNAC, G.; LONVAUD-FUNEL, A. Identification of salivary *Lactobacillus rhamnosus* species by DNA profiling and a sepecific probe. **Research Microbiology**, Amsterdam, v. 152, p. 157-165, 2001.

ROBERFROID, M.D. Funcional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligossacharides. **Nutrition Reviews** , New York,v.54, p. s38-s42, 1996.

ROHLF, F. J. NTSYS, P.C. Micro-computer programs for numerical taxonomy and multivariate analysis. **American Statistician**, Washington,v.41, p.330, 1987.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2th ed. New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, 1989.

SÁNCHEZ, I.; SESENÃ, S.; POVEDA, J.; CABEZAS, L.; PALOP, L. Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli isolated from Spanish goat cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdan, 2006. (no prelo).

SANDERS, M.E. Probiotics. **Food Technology**, Chicago, v. 53, p. 67-75, 1999.

SHARPE, E.M. Taxonomy of the lactobacilli. **Dairy Science Abstracts**, Farnham Royal, GB, v. 24, n.3,109-19, 1962.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. (Eds.). **Numerical Taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973.

STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 36, p.1-29, 1997.

SULLIVAN, M. G. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora: a overview. **Bulletin/ International Dairy Federation**, Brussels,. p. 23-29. 1996.

TORRIANI, S.; CLEMENTI, F.; VANCANNEYT, HOSTE, B.; DELLAGLIO, F.; KERSTERS, K. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 24, p.554-560, 2001.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, Barking, v. 36, p.895-904, 2003.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A., R.; LIVAK, K. ; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, 6531-6535, 1990.

XANTHOPOULOS, V.; LITOPOULOU-TANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. **Food Microbiology**, London, v. 17, p.205-215. 2000.

CAPITULO 2

SUSCEPTIBILIDADE “ IN VITRO” À ACIDEZ, SAIS BILIARES E FENOL DE LACTOBACILOS ISOLADOS DE FEZES DE CRIANÇAS.

RESUMO

Foi realizado um experimento em que 30 cepas de lactobacilos, isoladas de fezes de crianças com até um ano de idade, foram avaliadas “in vitro” na sua capacidade de resistir a condições específicas do trato gastrointestinal, como resistência aos sais biliares (Oxgall), a acidez e tolerância à concentração de 0,3% de fenol. Cepas de *L. casei* (Lc 01TM) e *L. acidophilus* (La-05TM) foram incluídas como controle. Observou-se que oito isolados possuem as propriedades desejáveis para sobreviverem às condições do trato gastrointestinal e se caracterizaram como promissoras para serem usadas como probiótico.

Palavras chave: *L. casei*, *L. acidophilus*, trato gastrointestinal, propriedades probióticas.

ISOLATED *Lactobacillus* STRAINS: SUSCEPTIBILITY TO THE GASTROINTESTINAL CONDITIONS AND ANTIBIOTICS RESISTANCE “IN VITRO”.

ABSTRACT

An assay was carried out screening 30 strains of *Lactobacillus* from infants (below one year old), feces and it was evaluated the bacterial resistance to the bile salts (Oxgall), acidity, and 0.3% phenol concentration. *L. casei* (Lc 01TM) e *L. acidophilus* (La-05TM) commercial strains were used as control. The results indicated that eight of the investigated strains were able to survive under gastrointestinal stress condition, allowing their use as probiotics.

Key words: gastrointestinal tract, *L. casei*, *L. acidophilus*, probiotic properties.

1 INTRODUÇÃO

Os probióticos, conhecidos como microrganismos viáveis comumente adicionados aos alimentos, são normalmente administrados oralmente, principalmente em produtos lácteos (HAMILTON; SHAH; WINKLER, 1999). Para os probióticos utilizados desta forma, é importante a sua sobrevivência durante o trânsito através do trato gastrointestinal, o que implica na habilidade destes microrganismos em sobreviverem à acidez do estômago e à bile, para que possam exercer seus efeitos benéficos no hospedeiro (COLLINS; THORNTON; O' SULLIVAN, 1998).

Os microrganismos ingeridos juntamente com o alimento iniciam sua trajetória no trato intestinal através da boca, sendo expostos durante seu trânsito a sucessivos fatores estressantes que influenciarão a sua sobrevivência. Logo no início, deverão resistir às enzimas da cavidade oral, entre elas a lisozima. Posteriormente, outro ambiente hostil, é o estômago, sendo considerado que o tempo de entrada e liberação do estômago é de aproximadamente 90 minutos (BERRADA; LEMELAND; LAROCH, 1991).

A sobrevivência das bactérias ao suco gástrico depende da sua habilidade em tolerar o baixo pH. O pH do ácido clorídrico secretado no estômago é de 0,9, que em presença de alimento aumenta para 3,0 (ERKKILA; PETAJA, 2000).

Cerca de 2,5 litros de suco gástrico com pH de aproximadamente 2,0 são secretados por dia no estômago causando a destruição da maioria dos microrganismos. Neste sentido, a resistência ao trânsito gástrico em humanos é um importante critério de seleção para microrganismos probióticos, sendo considerado que a habilidade de uma bactéria probiótica sobreviver a passagem através do estômago é variável e estirpe-dependente (CHARTERIS; KELLY; MORELLI, 1998).

A bile, secretada no fígado e lançada no intestino delgado, reduz a sobrevivência das bactérias por destruir sua membrana celular, cujos principais componentes são os lipídeos e ácidos graxos (GILLILAND; SPECK, 1987). A taxa de secreção pelo fígado e a concentração da bile depende, principalmente, do tipo de alimento consumido (LANKAPUTHRA; SHAH, 1995) e, segundo Conway, Gorbach e Golden (1987), a concentração de bile no trato gastrointestinal humano, em um determinado momento, é variável e difícil de prever.

Os sais biliares são sintetizados no fígado a partir do colesterol, armazenados na vesícula biliar, e liberados no duodeno após a ingestão de alimentos gordurosos, tendo

função detergente (ERKKILA; PETAJA, 2000). Entretanto, alguns microrganismos são capazes de reduzir este efeito detergente pela habilidade de hidrolisar sais biliares e diminuir sua solubilidade, através da enzima sais biliares hidrolase (BSH). A atividade BSH tem sido encontrada em muitos gêneros, incluindo *Lactobacillus*. A resistência aos sais biliares varia muito entre as espécies de *Lactobacillus* e também entre as cepas, sendo este mecanismo ainda desconhecido (PENNACHIA et al., 2004).

Não existe correlação entre o potencial da bactéria desconjugar sais biliares e sua habilidade em resistir ao efeito da bile, sendo que ainda não está clara a função fisiológica desta atividade hidrolítica. Por outro lado, a reabsorção de sais biliares primários/secundários na circulação entero-hepática é reduzida após sua desconjugação. E, devido ao fato de que o aumento na concentração de ácido biliar pode afetar a carcinogênese no intestino grosso, a discussão sobre os riscos e benefícios da desconjugação de sais biliares na saúde, em humanos, permanece contraditória (HALLER; COLBUS; GANZLE, 2001).

Além dos sais biliares, existe no intestino a presença de compostos tóxicos como por exemplo, o fenol. Este composto é produzido pela microbiota intestinal pois, como esta é composta por diferentes espécies bacterianas, há a conversão de várias substâncias em produtos tanto benéficos como nocivos ao hospedeiro (MITSUOKA, 1996). Bactérias intestinais como as enterobactérias, peptostreptococos, clostrídios e eubactérias produzem urease, que hidrolisa a uréia em substâncias potencialmente tóxicas como amônia, fenóis, aminas farmacologicamente ativas e indol, que normalmente são detoxificadas no fígado antes da excreção nas fezes e urina (RASIC; KURMANN, 1983).

Diante disto, o objetivo do presente trabalho foi selecionar, através de testes “in vitro” que simulam as condições do trato gastrointestinal, alguns isolados com características probióticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina e no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Microorganismos:

Os isolados foram obtidos de fezes de crianças de ambos os sexos da creche da Universidade Estadual de Londrina, com até um ano de idade, durante os meses de novembro e dezembro de 2004.

Estes isolados foram testados quanto à resistência aos sais biliares, tolerância às condições ácidas e fenol.

Manutenção dos isolados:

Todos os isolados, com exceção das cepas da Chr. Hansen que eram liofilizadas, foram repicados em mantidos em caldo MRS adicionado de glicerol e armazenados a -20°C para serem oportunamente descongelados e reativados.

Reativação:

A reativação dos isolados foi realizada a partir de 1% (v/v) das culturas congeladas, inoculadas em caldo MRS e posteriormente incubadas a 37°C durante 24 horas. Este procedimento foi repetido três vezes.

Determinação de resistência aos sais biliares:

Para determinação da resistência aos sais biliares, após três reativações em caldo MRS, os isolados foram inoculados na proporção de 1% (v/v), em caldo MRS e em caldo MRS adicionado de 0,3% de bile (Oxgall). Procedeu-se a determinação da absorbância do cultivo em espectrofotômetro a 620 nm, nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 15, 18, 21 e 24 horas. Foram feitas também as contagens dos isolados submetidos aos tratamentos com e

sem Oxgall, através do plaqueamento em profundidade em ágar MRS, nos tempos 0 e 24 horas (GILLILAND; STALEY; BUSH, 1984).

As bactérias consideradas resistentes à bile foram selecionadas para os testes a seguir e comparadas com cepas padrão de *L. casei* (Lc 01TM) e *L. acidophilus* (La-05TM).

Tolerância às condições ácidas:

Foi realizado um experimento em esquema fatorial 3X4, sendo os fatores representados pelo pH (caldo MRS ajustado para pH 2,0; 3,0 e 6,5 através da adição de HCl) e pelo tempo. Determinou-se a contagem das células viáveis através do plaqueamento em ágar MRS incubados 37°C por 2 a 3 dias, nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas (LIN ; CHEN, 2000).

Determinação de tolerância ao fenol:

A tolerância ao fenol foi verificada inoculando-se 1% v/v da cultura ativa em 100 ml leite desnatado reconstituído (LDR) a 10%, contendo 0,3% de fenol, sendo feitas determinações de pH e acidez titulável (LABORATÓRIO, 1981). O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, sendo a unidade experimental representada pelos isolados, e três repetições.

Os dados obtidos foram analisados por intermédio do Sistema de Análises Estatísticas – SAEG, UFV (1999). Os tratamentos foram comparados pelo teste Student Neuman Keuls a 5 % de probabilidade, sendo feitas análises de regressão nos diferentes tempos para os dados provenientes da tolerância a condições ácidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 30 isolados pré-selecionados foram testados para verificar sua resistência a bile. Os resultados de crescimento, em logaritmo das ufc/ml, estão apresentados na Tabela 1. Segundo Gilliland, Staley e Bush (1984), para uma bactéria ser considerada resistente à bile, esta deverá atingir o valor 0,3 de absorbância após 6 horas de incubação. Comparando-se os resultados de crescimento (Tabela 1) com os de absorbância obtidos (Tabela 2), verificou-se que os isolados L4, L24, L20, L23, L19, L22 poderiam ser classificados como resistentes, apesar de apresentarem valores de absorbância maiores que 0,3 somente após 10 horas de incubação.

Tabela 1: Resistência aos sais biliares dos isolados após crescimento em cultivos com 0,3% de Oxgall.

Isolado	MRS Normal			MRS + Oxgall		
	Tempo 0	Tempo 24	Crescimento	Tempo 0	Tempo 24	Crescimento
L1	6,63	8,56	1,93	6,51	6,70	0,19
L2	6,58	8,79	2,21	6,35	7,14	0,79
L3	6,48	8,85	2,37	6,50	6,35	-0,15
L4	7,40	9,12	1,72	6,88	8,74	1,86
L5	6,82	9,07	2,25	6,77	7,67	0,90
L6	6,52	8,71	2,19	6,22	6,42	0,20
L7	6,60	8,64	2,04	6,54	6,27	-0,27
L8	6,38	8,77	2,39	6,18	6,10	-0,08
L9	6,50	8,93	2,43	6,60	6,68	0,08
L10	6,69	8,97	2,28	6,49	6,51	0,02
L11	6,61	8,81	2,20	6,47	6,72	0,25
L12	6,51	8,56	2,05	6,50	6,99	0,49
L13	6,60	8,82	2,22	6,47	6,41	-0,06
L14	6,83	8,91	2,08	6,77	6,56	-0,21
L15	6,81	8,69	1,88	6,69	6,59	-0,10
L16	6,46	8,42	1,96	6,11	5,61	-0,50
L17	6,64	8,89	2,25	6,61	1,75	-4,86
L18	7,12	9,20	2,08	5,00	3,48	-1,52
L19	7,31	8,52	1,21	7,15	8,15	1,00
L20	7,30	9,12	1,82	7,06	8,57	1,51
L21	7,31	8,90	1,59	5,08	4,95	-0,13
L22	7,35	8,83	1,48	7,10	8,08	0,98
L23	7,22	8,88	1,66	7,07	8,28	1,21
L24	7,25	9,20	1,95	7,17	8,68	1,51
L25	7,47	9,38	1,91	4,93	5,19	0,26
L26	8,67	8,48	0,19	6,18	5,77	-0,41

L27	6,87	8,68	1,81	6,43	6,49	0,06
L28	6,80	9,11	2,31	6,66	7,43	0,77
L29	6,87	8,80	1,93	6,46	6,27	-0,19
L30	6,71	8,76	2,05	6,72	6,45	-0,27

Resultados médios com valores expressos em Logarítmos do número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml).

Crescimento= \log_{10} (população final) - \log_{10} (população inicial)

Tabela 2: Valores médios de absorvância a 620 nm dos isolados selecionados após 10 horas de incubação à 37°C em meio MRS contendo 0,3% de sais biliares.

Cepas	Caldo MRS controle	Caldo MRS + 0,3% de Oxygall
L4	2,081	1,690
L24	2,260	1,793
L20	2,215	1,644
L23	2,092	0,932
L19	2,102	1,775
L22	2,236	1,674

De acordo com os resultados obtidos, pode-se classificar as bactérias isoladas, segundo Deschamps et al., (apud SARON 2003), em quatro grupos diferentes, o primeiro grupo é representado pelas culturas resistentes, ou seja, aquelas que apresentam um rápido crescimento em meio contendo Oxygall, como os isolados L24, L4, L22, L19, L23, L5 e L20. As Figuras 1 a 7, apresentadas a seguir, representam o comportamento destes isolados em meio MRS contendo o agente inibidor, Oxygall, na concentração de 0,3%.

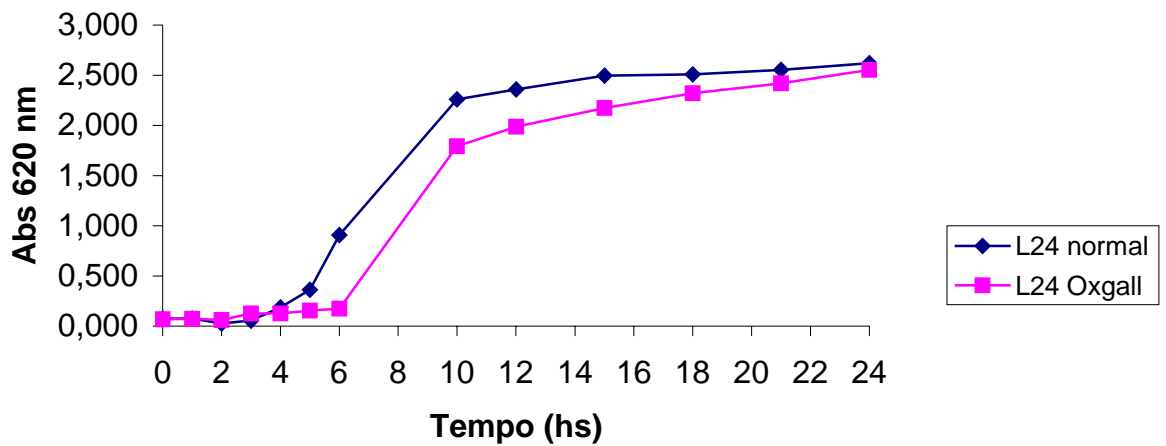


Figura 1: Curva de crescimento do isolado L24 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de Oxgall

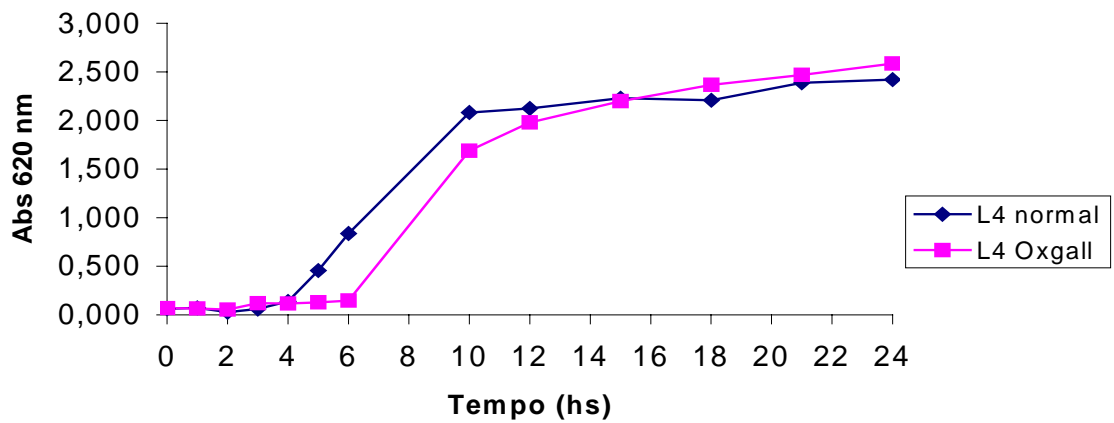


Figura 2: Curva de crescimento do isolado L4 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de Oxgall.

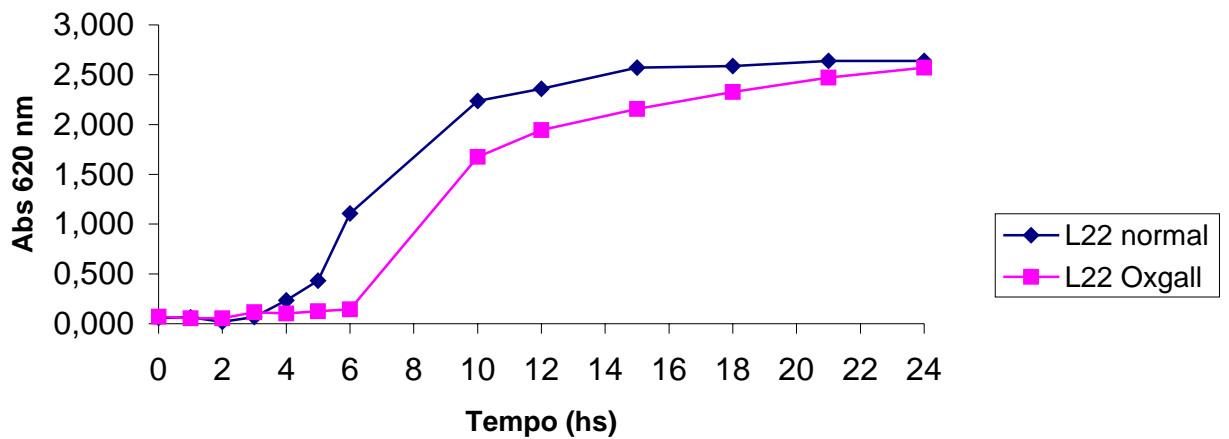


Figura 3: Curva de crescimento do isolado L22 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de Oxgall.

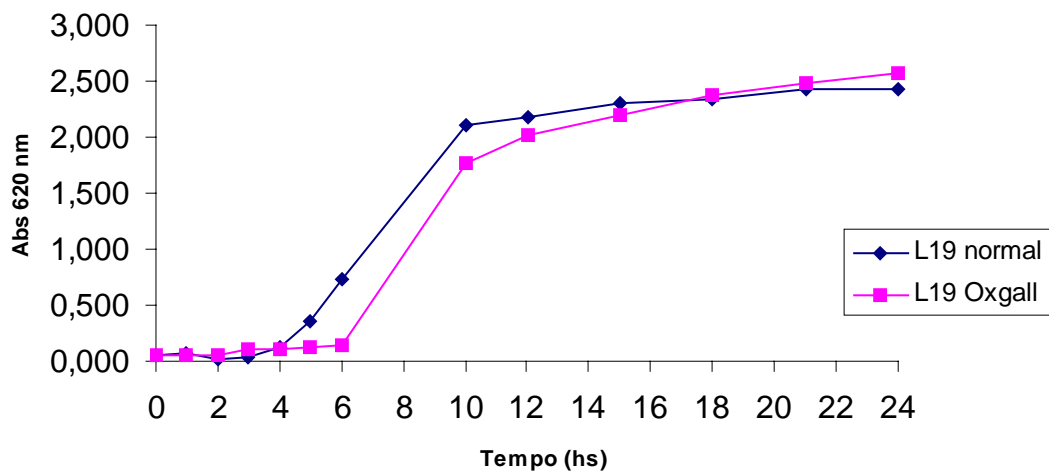


Figura 4: Curva de crescimento do isolado L19 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de Oxgall.

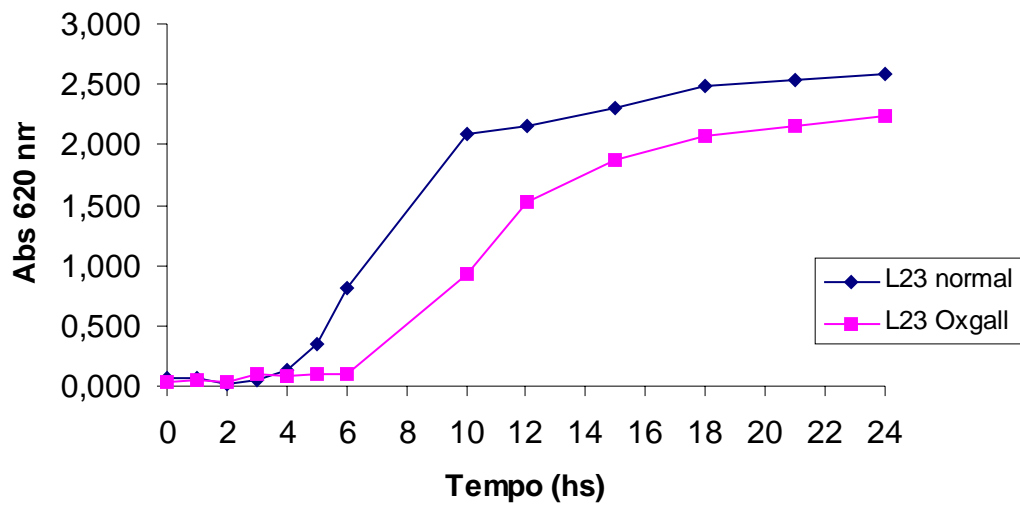


Figura 5: Curva de crescimento do isolado L23 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de Oxgall.

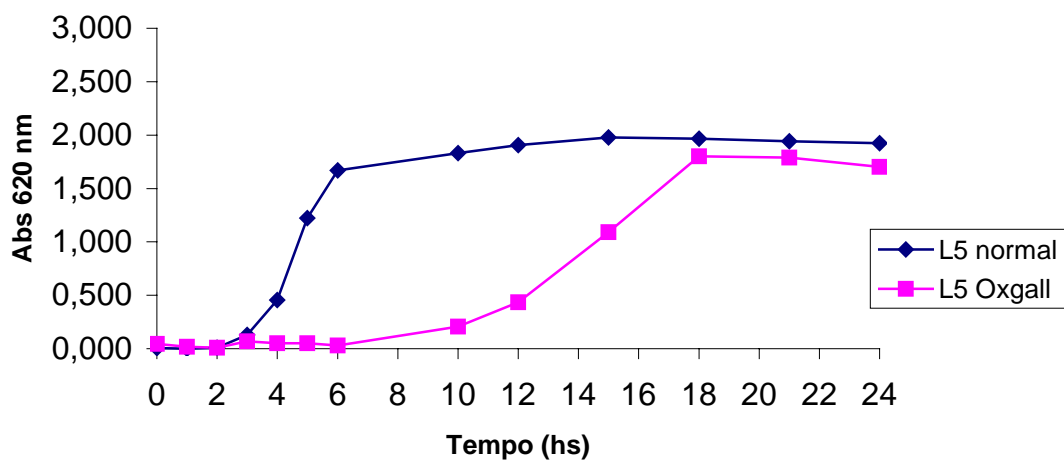


Figura 6: Curva de crescimento do isolado L5 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de Oxgall.

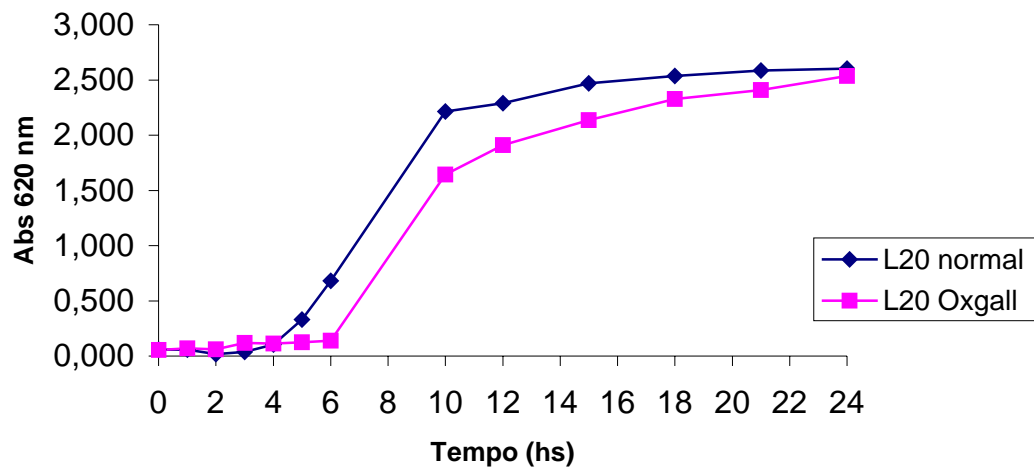


Figura 7: Curva de crescimento do isolado L20 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de Oxgall.

Verificou-se que as curvas de crescimento mostraram-se semelhantes, com aumento nos valores de absorvância somente após as 10 horas de incubação, exceto o isolado L5 que obteve no tempo 10 horas o valor em d.o. de 0,208 e após mais duas horas de incubação este valor aumentou para 0,434 .

As culturas tolerantes são aquelas que não se desenvolvem rapidamente em meio MRS contendo bile, como o isolado L12. A Figura 8 representa a curva de crescimento do isolado selecionado L12 que apresentou valor de densidade óptica de 0,426 após 15 horas de incubação.

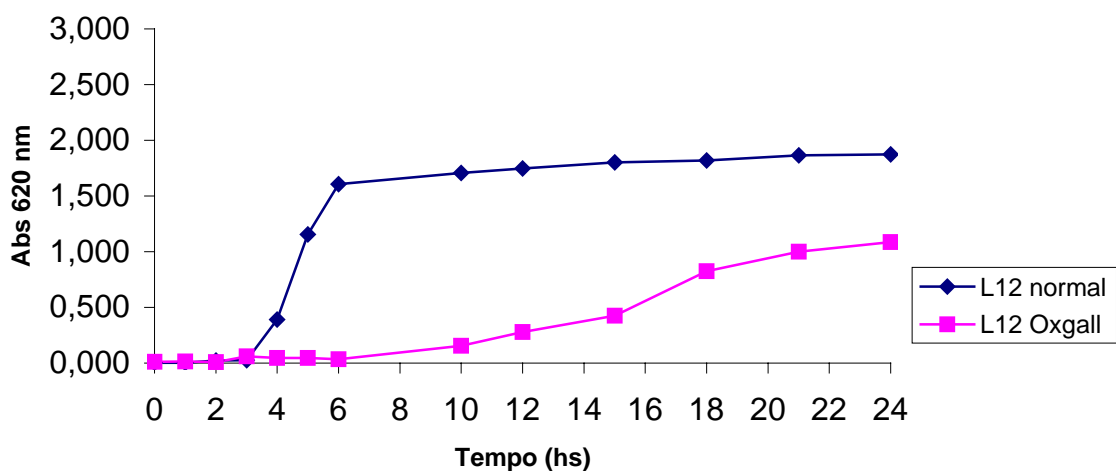


Figura 8: Curva de crescimento do isolado L12 em caldo MRS normal e MRS contendo 0,3% de Oxgall.

As culturas pouco tolerantes são consideradas aquelas que somente sobrevivem na presença de sais biliares como os isolados L1, L25, L29, L21, L7, L10, L9, L26, L15, L2, L11, L13, L14, L3, L27 e culturas sensíveis, que não crescem e se degradam na presença de sais biliares, como os isolados L8, L17, L30 e L16.

A tolerância diferenciada de lactobacilos na presença de sais biliares foi também constatado por Gardiner et al. (2002) que avaliaram a tolerância de *L. fermentum* e *L. rhamnosus* em diferentes concentrações de Oxgall (0,0; 0,15; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0%) e verificaram que a viabilidade de ambos não foi reduzida nas concentrações de 0,3 e 0,5 % de Oxgall, concluindo que tais bactérias poderiam ser consideradas tolerantes a bile, uma vez que a concentração de 0,3% é considerada fisiologicamente relevante.

Entretanto, Gilliland, Staley e Bush (1984) compararam a habilidade de sete cepas de lactobacilos em crescer em MRS, com e sem 0,3% de Oxgall, e verificaram que quando comparadas com o caldo controle, o Oxgall mostrou-se inibitório para todas elas, selecionando apenas três cepas.

Garcia (1999) observou que das 21 cepas pré-selecionadas, ou seja, 52% das culturas apresentaram absorvância, em comprimento de onda de 620 nm, maior que 0,3 após 6 horas de incubação, obtendo os valores de densidade óptica que variaram entre 0,6435 a 1,2522 para os isolados considerados mais resistentes.

Os resultados de resistência à acidez dos isolados selecionados estão na Tabela 3. Foram observadas interações significativas entre pH e tempo, sendo que os coeficientes de variação oscilaram entre 3,33 e 9,96.

Verificou-se que no tempo 0 não houve diferença significativa nas contagens, pelo teste de SNK ($P < 0,05$), entre diferentes valores de pH estudados; entretanto os isolados L4, L12, L19, e L23 apresentaram as contagens em pH 2,0 menores e estatisticamente diferentes em relação às observadas em pH 3,0 e controle; sendo estes dois valores de pH estatisticamente semelhantes, exceto o isolado L22, que apresentou médias semelhantes em pH 2,0 e 3,0.

Após 1 hora de incubação, constatou-se diferença nas médias obtidas em pH 2,0 em relação ao pH 3,0 e controle, exceto para os isolados L22 e *L. casei*, cujas contagens diferiram estatisticamente nos três valores de pH. Nos tempos 2 e 3 horas, verificou-se que as contagens diferiram estatisticamente em pH 2,0; 3,0 e controle em todos os isolados, exceto L20 e L23 que obtiveram médias estatisticamente semelhantes entre pH 3,0 e controle, sendo, portanto os isolados que apresentaram menor influência do baixo pH (pH 3,0) nas contagens.

Tabela 3: Crescimento (log ufc/ml) dos isolados expostos ao ácido clorídrico (HCl 0,1 N) por até 3 horas.

Isolado	Tempo (hs)			
	0	1	2	3
L4 Controle	6,88 ± 0,14 ^a	6,95 ± 0,04 ^a	7,11 ± 0,16 ^a	7,46 ± 0,10 ^a
L4 pH 2,0	6,30 ± 0,20 ^b	3,78 ± 0,01 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c
L4 pH 3,0	6,84 ± 0,11 ^a	6,85 ± 0,15 ^a	6,44 ± 0,31 ^b	6,28 ± 0,22 ^b
L5 Controle	6,95 ± 0,06 ^a	6,90 ± 0,10 ^a	7,11 ± 0,08 ^a	7,54 ± 0,12 ^a
L5 pH 2,0	6,47 ± 0,65 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c
L5 pH 3,0	6,87 ± 0,06 ^a	6,73 ± 0,21 ^a	6,08 ± 1,00 ^b	5,39 ± 1,09 ^b
L12 Controle	6,59 ± 0,08 ^a	6,71 ± 0,15 ^a	6,73 ± 0,11 ^a	7,35 ± 0,31 ^a
L12 pH 2,0	5,28 ± 1,11 ^b	4,88 ± 0,05 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c
L12 pH 3,0	6,41 ± 0,15 ^a	6,27 ± 0,41 ^a	4,5 ± 1,17 ^b	5,05 ± 0,02 ^b
L19 Controle	7,26 ± 0,17 ^a	7,30 ± 0,20 ^a	7,43 ± 0,17 ^a	7,45 ± 0,12 ^a
L19 pH 2,0	6,39 ± 0,53 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c
L19 pH 3,0	7,16 ± 0,13 ^a	7,14 ± 0,15 ^a	6,36 ± 0,40 ^b	5,87 ± 0,01 ^b
L20 Controle	7,22 ± 0,38 ^a	7,21 ± 0,33 ^a	7,31 ± 0,33 ^a	7,38 ± 0,35 ^a
L20 pH 2,0	6,55 ± 0,09 ^a	4,45 ± 0,03 ^b	3,04 ± 0,02 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
L20 pH 3,0	7,17 ± 0,41 ^a	6,97 ± 0,64 ^a	6,86 ± 0,78 ^a	6,84 ± 0,81 ^a
L22 Controle	7,36 ± 0,25 ^a	7,33 ± 0,20 ^a	7,36 ± 0,22 ^a	7,49 ± 0,26 ^a
L22 pH 2,0	6,21 ± 0,40 ^b	4,63 ± 0,01 ^c	2,34 ± 0,01 ^c	0,00 ± 0,00 ^c
L22 pH 3,0	6,25 ± 0,55 ^b	6,23 ± 0,63 ^b	6,05 ± 0,36 ^b	6,01 ± 0,38 ^b
L23 Controle	6,99 ± 0,07 ^a	7,18 ± 0,06 ^a	7,22 ± 0,05 ^a	7,38 ± 0,10 ^a
L23 pH 2,0	6,14 ± 1,24 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
L23 pH 3,0	7,04 ± 0,04 ^a	7,04 ± 0,05 ^a	7,33 ± 0,56 ^a	6,89 ± 0,32 ^a
L24 Controle	7,25 ± 0,17 ^a	7,29 ± 0,20 ^a	7,33 ± 0,14 ^a	7,51 ± 0,28 ^a
L24 pH 2,0	7,17 ± 0,15 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^c
L24 pH 3,0	7,00 ± 0,09 ^a	7,17 ± 0,09 ^a	7,26 ± 0,18 ^a	7,09 ± 0,39 ^b
<i>L. casei</i> Controle	7,23 ± 0,31 ^a	7,26 ± 0,23 ^a	7,32 ± 0,28 ^a	7,42 ± 0,27 ^a
<i>L. casei</i> pH 2,0	7,08 ± 0,42 ^a	1,81 ± 0,01 ^c	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^c
<i>L. casei</i> pH 3,0	7,15 ± 0,41 ^a	6,18 ± 0,06 ^b	6,30 ± 0,01 ^c	6,80 ± 0,04 ^b

*Valores médios provenientes de 3 repetições, expressos em Log (UFC/ml).

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Student Neuman Keuls a 5% de probabilidade.

Os isolados que apresentaram maior resistência em pH 2,0 foram L20 e L22, que perderam a viabilidade somente após 3 horas de incubação.

Succi et al. (2005) testaram 63 cepas de *L. rhamnosus* em relação a sua habilidade em crescer em baixos valores de pH, sendo utilizado ácido clorídrico ou a combinação de ácido láctico e clorídrico com diferentes porcentagens de sais biliares (1,0; 1,5 e 2,0%). Dentre os isolados estudados, somente três cepas mostraram maior crescimento em tais condições. Observaram também redução de 2 a 3 ciclos log após 2 ou 4 horas de incubação em pH 3,0 e, em pH 2,0, ocorreu diminuição entre 6 a 8 ciclos log. Entretanto,

quando o pH foi ajustado para 7,0 e adicionou-se 2,0% de sais biliares, observaram melhor sobrevivência para a maioria das cepas testadas, concluindo que os microrganismos foram mais afetados pela faixa de pH, que pela exposição a diferentes concentrações de sais biliares.

Chou e Weimer (1999) isolaram e caracterizaram cepas de *L. acidophilus* ajustando o pH do meio MRS para 4,0; 5,0; 6,0 ou 7,0 acrescentando 0,3% de ácido glicólico, glicodesoxicólico, taurocólico ou oxgall. Os autores observaram que em pH 4,0 todos os isolados testados foram inibidos nos ácido glicocólico e oxgall, enquanto que após 24 horas de incubação a maioria das cepas cresceu em pH 5,0 ou 7,0 em presença dos sais biliares.

Neumann e Ferreira (1995) avaliando três cepas de lactobacilos isoladas de humanos verificaram sensibilidade após 24 horas em presença de suco gástrico artificial, pois após 3 horas as contagens obtidas, em log, foram de 1,74; 2,37 e 3,22. Oxgall a 0,3% pareceu ser inibitório para as três culturas, atingindo absorvância maior que 0,3 somente após 8 horas de incubação. Os autores ressaltam tais isolados poderiam ser resistentes “in vivo” visto que este experimento não permitiu a recirculação dos sais biliares, que remove os sais desconjugados do trato intestinal humano que possui efeito mais inibitório do que os conjugados.

Ronka et al. (2003) utilizaram duas cepas de *L. brevis* e avaliaram o efeito do baixo pH, por meio da adição de ácido clorídrico e também a suplementação de 0,3% de Oxgall ao caldo MRS. Os autores verificaram que ambas as cepas mantiveram sua viabilidade no caldo em pH 4,0, entretanto, quando houve diminuição do pH para 2,0, houve uma redução de 2 a 7 ciclos log no número de células viáveis após 3 horas de incubação. Em presença de bile as contagens obtidas para o tempo 0 foram de $4,88 \times 10^7$ e $3,45 \times 10^7$ e no tempo 24 horas $1,22 \times 10^7$ e $3,60 \times 10^7$, portanto, *L. brevis* poderia ser suplementado em iogurte ou outro produto lácteo.

Xanthopoulos, Litopoulo-Tanetaki e Tzanetakis (2000) determinaram a resistência de lactobacilos isolados de recém-nascido a condições de baixo pH, utilizando-se solução tampão salina (PBS) ajustada para pH 3,0 e a sais biliares (0,15 e 0,50 %). A viabilidade da maioria das bactérias diminuiu rapidamente após 2 horas sob condições ácidas, sendo *L. reuteri* considerado menos resistente, apresentando contagem em log, de 1,70 e *L. paracasei subsp. paracasei* a cepa mais resistente apresentando contagens de 9,69. Na presença de Oxgall, ocorreram variações entre os isolados com relação ao crescimento, as cepas mais resistentes, após 24 horas foram *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, que apresentaram as contagens médias de 7,93 e 8,96, respectivamente.

Gupta, Mital e Garg (1996) caracterizaram cepas de *Lactobacillus acidophilus* para serem usadas como adjunto dietético e verificaram que na concentração de 0,3% de Oxgall, três cepas foram completamente inibidas, enquanto outras exibiram 44 a 82% de inibição e que nenhum isolado cresceu em pH 2,0 quando ácido clorídrico era adicionado ao caldo MRS; dados semelhantes também foram obtidos por Hood e Zottola (1988). Entretanto, Conway, Gorbach e Golden (1987) observaram melhor taxa de sobrevivência de *L. acidophilus* quando comparada a *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, em baixo pH.

Saron (2003) avaliou a resistência de *Lactobacillus acidophilus* La-5 às condições de acidez (pH 2,5) no meio MRS adicionado de ácido clorídrico, com e sem a suplementação de 2% lactulose e verificou que a sobrevivência de tal bactéria se manteve praticamente igual em MRS com e sem suplementação durante as 3 horas de observação. O número inicial de La-5 foi de 10^8 UFC/ml, reduzindo-se para 10^7 UFC/ml após 1 hora e 10^6 UFC/ml após 2 horas, sendo que, após 3 horas de incubação manteve-se em 10^6 UFC/ml. A taxa de sobrevivência do *L. acidophilus* demonstrou que esta cultura é bastante resistente às condições de acidez em pH 2,5. A resistência à concentração de 0,3% de sais biliares também foi testada, sendo constatado que tal resistência aumentou com a presença de lactulose no meio.

Suscovic et al. (1997) encontraram alta tolerância de *L. acidophilus* a pH 3,0. Conway et al (1987) também observaram melhor taxa de sobrevivência de *L. acidophilus* quando comparada a *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* em baixo pH.

Haller, Colbus e Ganzle (2001) verificaram o efeito da fase de crescimento de *L. sakei* no seu potencial para tolerar condições ácidas e bile. No início da fase exponencial de crescimento (5-8 horas) o efeito bactericida do ácido clorídrico em combinação com o ácido cólico foi máximo (redução > 5 log), sendo que a tolerância foi aumentada (redução de 2,8 log) no final da fase exponencial (12 horas). A melhor tolerância (redução de 1,4 log) foi evidenciada no final da fase exponencial (24 horas). No final da fase estacionária (48 horas) o número de bactérias tolerantes (redução de 1,5 log) permaneceu similar quando comparada com a fase estacionária, embora densidade celular tenha diminuindo de 8,1 para 7,4 log, sugerindo que a fase de crescimento da bactéria afeta sua tolerância.

Pennachia et al. (2004) isolaram e identificaram 150 cepas de lactobacilos verificaram que somente 27 cepas cresceram em presença de 0,3% de sais biliares e pH 2,5 (PBS) sendo completamente inibidas com o aumento do tempo de incubação.

Mainville, Arcand e Farnwoth (2005) estudaram o comportamento de algumas cepas probióticas e verificaram que apesar de *Lactobacillus* GG apresentar redução

de 2 ciclos log após 15 minutos em pH 2,0 (utilização de ácido clorídrico); esta cepa pode alcançar o cólon em número suficiente para apresentar efeitos benéficos a saúde e que, somente bactérias altamente resistentes a condições ácidas sobreviveriam. Portanto, ao se empregar critérios convencionais de exclusão, muitas cepas poderiam ser descartadas, apesar de possuírem propriedades desejáveis à manutenção da saúde.

A baixa sobrevivência de cepas probióticas em condições que simulem a passagem através do trato gastrointestinal segundo Erkkila e Petaja (2000), depende da estirpe utilizada, sendo desta forma, necessário uma adequada seleção das cepas na elaboração de produtos lácteos probióticos (VINDEROLA; REINHEIRMER, 2003).

Os isolados selecionados foram testados para verificar sua tolerância ao fenol. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores determinados de pH e porcentagem de acidez dos isolados cultivados em LDR (Leite Desnatado Reconstituído) a 10%, sem e com adição de 0,3% de fenol, incubados por 3 dias a 35°C.

Isolados	pH controle	pH com fenol	% de Acidez	% de Acidez	% Redução
			Controle	com fenol	
L4	4,84±0,04	5,86±0,02	0,570±0,02	0,284±0,02 ^c	50,17
L5	4,66±0,12	5,49±0,16	0,624±0,09	0,348±0,06 ^c	44,23
L12	4,63±0,19	5,16±0,18	0,670±0,09	0,481±0,04 ^b	28,20
L19	5,17±0,35	5,73±0,13	0,407±0,08	0,304±0,03 ^c	25,31
L20	4,62±0,02	5,72±0,21	0,648±0,07	0,293±0,05 ^c	54,78
L22	5,20± 0,45	5,60±0,15	0,422± 0,11	0,321±0,04 ^c	23,93
L23	4,80±0,29	5,63±0,32	0,559±0,15	0,338±0,05 ^c	39,53
L24	5,25±0,48	5,95±0,10	0,396±0,12	0,268±0,04 ^c	32,32
<i>L casei</i>	3,87±0,20	5,91±0,49	1,163±0,15	0,294±0,08 ^c	74,72
<i>L. acidophilus</i>	3,54±0,05	4,04±0,07	1,749±0,19	1,039±0,07 ^a	40,59

*Valores médios provenientes de 3 repetições.

% Redução= % de acidez sem fenol - % de acidez com fenol/ % de acidez sem fenol.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Student Neuman Keuls a 5% de probabilidade.

Os isolados L19, L22 e L24 apresentaram uma baixa acidificação do leite durante o período de incubação, sendo encontrados os valores de pH de 5,17; 5,20 e 5,25, respectivamente. Entretanto estes isolados apresentaram menor porcentagem de redução de

acidez. Estes valores de pH estão abaixo do considerado desejado a um produto fermentado, pois de acordo com Ronka et al. (2003) este deverá oscilar entre 4,4 a 4,6. Da mesma forma, Arici et al. (2004) verificaram que os valores de pH do leite, de cepas de lactobacilos provenientes de crianças, foram menores que 5,50. Os isolados de mais acidificaram o leite foram L5, L12 e L20.

Houve diferença significativa entre os diferentes isolados com relação à acidez em presença de fenol pelo teste de SNK a 5 % de probabilidade. *L. acidophilus* e o isolado L12 obtiveram maiores valores de acidez, sendo estes estatisticamente diferentes entre si e também diferentes das demais bactérias, que apresentaram valores médios de acidez estatisticamente semelhantes. Entretanto, deve-se ressaltar que todas os isolados cresceram na presença de uma concentração de 0,3 % de fenol. PAULO (1991) verificou tolerância à concentração de 0,3% de fenol e completa inibição de lactobacilos em presença de 0,5% deste inibidor. Xanthopoulos, Litopoulo-Tanetaki e Tzanetakis (2000) verificaram um efeito bacteriostático sobre lactobacilos, em presença de 0,4% de fenol.

4 CONCLUSÃO

Os oito isolados selecionados, L4, L5, L12, L19, L20, L22, L23 e L24, apresentaram potencial de uso como probiótico, em função do comportamento demonstrado sob condições ácidas, utilizando-se ácido clorídrico e presença de sais biliares, por meio da adição de Oxgall ao meio MRS sendo também capazes de crescer na presença de fenol.

REFERÊNCIAS

- ARICI, M.; BILGIN, B.; SAGDIG, O.; OZDEMIR, C. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. **Food Microbiology**, London, v. 21, p. 19-24, 2004.
- BERRADA, N.; LEMELAND, J.F.; LAROCH, G. *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill, v. 74, p. 409-413, 1991.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, p.759-768, 1998.
- CHOU, L.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill, v. 82, p.23-31, 1999.
- COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; O'SULLIVAN, G. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, p. 487-490, 1998.
- CONWAY, P.L.; GORBACH, S.L.; GOLDEN, B.R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill, v. 70, p.1-12. 1987.
- ERKKILA, S.; PETAJA, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, Barking, v.55, p.297-300, 2000.
- GARCIA, S. **Isolamento e caracterização de bactérias lácticas para uso como probiótico**. 1999. 156 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos e Medicamentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- GARDINER, G.E.; HEINEMANN, C.; BAROJA, M.L.; BRUCE, A.W.; DEE, B.; MADRENAS, J.; REID, G. Oral administration of the probiotic combination *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 for human intestinal applications. **International Dairy Journal**, Barking, v.12, p. 191-196, 2002.
- GILLILAND, S.E.; STALEY, T.E.; BUSH, L.J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. **Journal Dairy Science**, Champaign Ill, v. 67, p.3045-3051, 1984.

GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 33, p. 15-18, 1987.

GUPTA, P.K.; MITAL, B. K.; GARG, S. K. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* strains for use as dietary adjunct. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 29, p.105-109. 1996.

HALLER, D.; COLBUS, H.; GANZLE, M.G. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 24, p.218-226, 2001.

HAMILTON, J.M.M.; SHAH, S.; WINKLER, J.T. Public health issues arising from microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. **Public Health and Nutrition**, v. 2, n.2, p. 223-229. 1999.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, S.A. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, p. 1514-1516, 1988.

LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL. **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus ingredientes**. Brasília, 1981. v. 1.

LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium ssp* in the presence of acid and bile salts. **Cultured Dairy Products Journal**, Washington, v.30, p.2-7, 1995.

LIN, M.; CHEN, T. Reduction of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* in culture broth. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 8, p. 97-102, 2000.

MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E.R. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, p.287-296, 2005.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and human health. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v 1, p.2-9, 1996.

NEUMANN, E.; FERREIRA, C.L.L.F. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct: "in vitro" susceptibility to gastric juice, bile salts, lysozyme and chemotherapeutic agents. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26 , p. 59-65, 1995.

PAULO, E.M. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de suínos para uso como probiótico.** 1991. 73 p. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PENNACHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotic. **Meat Science**, Barking, v. 67, p.309-317, 2004.

RASIC, J.L.; KURMANN, J.A. **Bifidobacteria and their role.** Basel: Birkhauser Verlag, 1983. 295 p.

RONKA, E.; MALINEN, E.; SAARELA, M.; RINTA-KOSKI, M.; AARNIKUNNAS, J.; PALVA, A. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.83, p.63-74. 2003.

SARON, M.L.G. **Aproveitamento do permeado de soro de leite bovino através de transformações da lactose em lactulose e como ingrediente para meios de cultura de bactérias probióticas.** 2003. 107 p. Tese (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade de Campinas, Campinas.

SUCCI, M.; TREMONTE, P.; REALE, A.; SORRENTINO, E.; GRAZIA, L.; PACIFICO, S.; COPPOLA, R. Bile salts and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 244, p. 129-137, 2005.

SUSCOVIC, J., BRKIC, B., MATOSIC, S., MARIC, V. *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. **Milchwissenschaft**, München, v. 52, p.430-435.1997.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas).** Viçosa: Imprensa Universitária, p. 1999. 59 p.

VINDEROLA, C.G; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “ in vitro ” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, Barking, v. 36, p.895-904, 2003.

XANTHOPOULOS, V.; LITOPOULOU-TANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. **Food Microbiology**, London, v.17, p.205-215, 2000.

CAPITULO 3

UTILIZAÇÃO DE PREBIÓTICOS POR ISOLADOS DE LACTOBACILOS E SUA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DA TERAPIA HUMANA

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a fermentação de oligossacarídeos por lactobacilos isolados e previamente selecionados como também a resistência destes isolados a alguns antibióticos comumente utilizados em humanos. Foi utilizado o caldo MRS isento de glicose e extrato de carne adicionado de 1% de oligofrutose, inulina ou goma acácia. Para o antibiograma, empregou-se o método de difusão em placa. Os resultados obtidos evidenciaram que todas cepas foram capazes de utilizar os substratos testados. Os isolados foram resistentes a eritromicina, porém não se determinou se esta característica era intrínseca ou adquirida.

Palavras-chave: goma acácia, inulina, microflora intestinal, oligofrutose.

ISOLATED *Lactobacillus spp* RESISTANCE TO ANTIBIOTICS FROM THE HUMAN THERAPY, AND THE USE OF PREBIOTICS BY THOSE STRAINS

ABSTRACT

The aim of the present work was to verify the oligosaccharides fermentation by eight selected strains, isolated from infant feces, as well as the resistance of those strains to antibiotics commonly used in humans. MRS medium was used in this experiment, substituting the glucose by 1% of oligofrutose, inulin or acacia gum. For the antibiogram, it was used the disk diffusion method. The obtained results evidenced that all strains were able to metabolize the substrates evaluated. All the isolated ones were resistant to streptomycin, however it was not determined the plasmids presence for the verification of the resistance transmission.

Key words: Acacia gum, intestinal microflora, inulin, oligofrutose.

1 INTRODUÇÃO

Prebióticos e Simbióticos

As bactérias lácticas, tais como os lactobacilos, são pertencentes ao grupo das bactérias benéficas, e atualmente existe um interesse na manutenção da predominância destes gêneros na microbiota intestinal humana. Em consequência, os probióticos têm sido usados para esta finalidade. No entanto, estas mudanças podem ser transientes e a implantação destas bactérias torna-se limitada (GORBACH; GOLDIN, 1992); frente a estas dificuldades introduziu-se o conceito de prebióticos.

Tem sido sugerido que a habilidade das bactérias probióticas em utilizar oligossacarídeos pode ser uma importante característica, devido à disponibilidade destes carboidratos, uma vez que os mesmos não são metabolizados e absorvidos no intestino delgado, influenciando assim no estabelecimento da microflora no cólon (MACFARLANE; CUMMINGS, 1999).

Os prebióticos são similares a outros carboidratos que alcançam o ceco, como polissacarídeos não amiláceos, álcoois de açúcares e amido resistente, que são substratos para a fermentação. Eles diferem no efeito seletivo exercido na microflora e em seu potencial de causar flatulência (CUMMINGS e MACFARLANE, 2001).

Devido ao fato de que tais carboidratos são utilizados por somente algumas cepas específicas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, dietas contendo os então denominados substratos prebióticos poderiam favorecer tais bactérias.

Prebióticos têm sido definidos como ingredientes alimentares não digestíveis, que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon. Entretanto, para um ingrediente ser classificado como prebiótico, o mesmo não deverá ser hidrolisado ou absorvido no intestino grosso, ser substrato seletivo para uma ou um número limitado de bactérias benéficas comensais no cólon, as quais são estimuladas a crescer e/ou são metabolicamente ativas; sendo desta forma capazes de alterar a flora no cólon a favor de uma composição saudável e induzir efeitos no lúmen ou sistêmicos que são benéficos para a saúde do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Entretanto, os prebióticos, segundo Ouwehand et al (2005), também podem ser indicados para promover a saúde no intestino delgado. Neste local, a comunidade

microbiana é pequena em termos numéricos e apresenta menor diversidade quando comparada ao cólon, sendo assim, diferentes prebióticos que são úteis no cólon poderiam ser usados. O trato urogenital também pode ser considerado um novo alvo para os prebióticos, pois abriga uma microbiota diversificada que também está sujeita a distúrbios. Ainda segundo o referido autor, diferentes estágios da vida requerem variados tipos de prebióticos para promover a saúde.

Os ingredientes alimentares que atendem a esses requerimentos são principalmente os frutooligossacarídeos (FOS) e inulina, além de galactooligossacarídeo (GOS), lactulose, isomalto-oligossacarídeo, xilo-oligossacarídeo, gentio-oligossacarídeos e oligossacarídeos.

Vários oligossacarídeos aumentam a multiplicação de células epiteliais, refletindo num aumento da área de superfície do ceco e massa do intestino delgado, ceco e cólon. Orban, Patterson e Sutton (1997) verificaram que há uma correlação inversa entre o pH do conteúdo intestinal e peso do ceco, área de superfície e profundidade de cripta do ceco, sendo estas mudanças morfológicas favoráveis à absorção de nutrientes. Os oligossacarídeos aumentam a absorção mineral havendo também uma relação inversa entre absorção mineral e o pH.

As bactérias intestinais capazes de crescer na presença de carboidratos são espécies sacarolíticas pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* e *Clostridium*. Entretanto, devido à extrema complexidade do ecossistema do intestino, vários grupos de bactérias são incapazes de degradar polímeros de carboidratos diretamente, porém bactérias sacarolíticas são rapidamente adaptadas para crescer em carboidratos complexos, devido à sua habilidade em produzir uma variedade de polihidrolases e glicosidases (SALYERS; LEEDLE, 1983). Embora algumas bactérias no cólon possam sintetizar diferentes tipos de enzimas sacarolíticas, o metabolismo de carboidratos é provavelmente dependente da cooperação de diferentes enzimas e várias espécies bacterianas fazem parte deste processo (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Os mecanismos pelos quais os oligossacarídeos prebióticos são seletivamente metabolizados pela microflora benéfica ainda não são adequadamente entendidos. Parece haver dois mecanismos no metabolismo de prebióticos. O mais bem conhecido é estas bactérias possuírem exoglicosidases. Tais enzimas atuam pela hidrólise de monossacarídeos a partir da extremidade não redutora da molécula do oligossacarídeo, sendo então captados pela célula. Este mecanismo parece ocorrer em *B. infantis*, que possui atividade β - frutofuranosidase (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

O outro mecanismo alternativo parece ser a captação de moléculas intactas de oligossacarídeos seguido pelo metabolismo intracelular, existindo algumas evidências de que este mecanismo ocorre em algumas espécies. Entretanto, o entendimento de como ocorrem estes dois mecanismos “in vivo” precisa ser melhor elucidado (RASTALL et al., 2005).

As análises de carboidratos mostram clara diferença na maneira de degradação entre as bactérias, pois cada uma utiliza os oligossacarídeos inulina e oligofrutose por uma via específica, evidenciando que as enzimas são constitutivas. Não se sabe, porém, se são específicas para cada substrato; pois as cepas mostram similar modo de utilização, sendo os oligossacarídeos menores os mais rapidamente utilizados (HATERMINK et al., 1997).

Estuda-se também, a possibilidade de manipulação da microflora pelo uso de simbióticos, que são probióticos e prebióticos usados em combinação. Os microrganismos vivos (probióticos) podem ser usados em combinação com substratos específicos (prebióticos), como por exemplo, o fornecimento de frutoligossacarídeo com bifidobactérias e lactitol com lactobacilos, sendo que esta combinação pode melhorar a sobrevivência das bactérias probióticas devido ao fato de que seu substrato específico está prontamente disponível para sua utilização, resultando em vantagens para o hospedeiro, proporcionada pela colonização destas bactérias (COLLINS; GIBSON, 1999).

Desta forma, o fornecimento de simbióticos afeta beneficentemente a saúde do hospedeiro aumentando a sobrevivência e implantação de microrganismos vivos (suplementados na dieta) no trato gastrointestinal, através da estimulação seletiva do crescimento e/ou pela ativação do metabolismo de um ou um número limitado de bactérias promotoras da saúde melhorando o bem estar no hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Lactobacillus e *Bifidobacterium* estão entre as bactérias encontradas na microflora do cólon que exercem efeitos benéficos no hospedeiro, e a administração de oligossacarídeos não digeríveis como rafinose, frutoligossacarídeos, galactosilactose, isomaltoligossacarídeo transgalactosil oligossacarídeos (TOS) são responsáveis por aumentos nas contagens destes microrganismos no intestino (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

A administração de bifidobactéria e FOS tem mostrado resultados promissores na diminuição no número de criptas anormais, embora não exista uma relação clara entre a presença destas criptas e o número de bifidobactérias e microrganismos produtores de toxinas (WALKER; DUFFY, 1998).

Um grupo específico de oligossacarídeos que tem atraído interesse comercial como prebiótico são os frutoligossacarídeos (FOS), que são uma série de unidades de frutose unidas por ligações à molécula de frutose da sacarose, podendo ainda ser produzidos via hidrólise da inulina ou via transfrutossilacção da sacarose, sendo também encontrados em muitos cereais, incluindo cevada, trigo e centeio (SULLIVAN, 1996).

Outro prebiótico é a inulina, que é um polissacarídeo não amiláceo que consiste em cadeias de unidades de frutose unidas por ligações β (2 \rightarrow 1) e que freqüentemente terminam com uma única molécula de glicose, ocorrendo naturalmente como carboidrato de reserva em muitas espécies de plantas. Estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” utilizando-se animais e humanos comprovam que a inulina pode ser considerada um prebiótico com fator bifidogênico, pois estimula seletivamente o crescimento de bactérias como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Bacteroides* em detrimento de microrganismos potencialmente patogênicos como *E. coli* e clostrídeos (HAVENAAR et al., 1999).

As plantas comestíveis com maior quantidade de inulina incluem a cebola, chicória, alho-poró, alho e trigo. Recentemente, o interesse neste oligossacarídeo tem aumentado devido às suas propriedades funcionais como substituto de gordura, seu poder adoçante, propriedades das fibras solúveis e como intensificador da saúde do trato gastrointestinal (ROBERFROID e DELENNE, 1998).

Causey et al. (2000) avaliaram a administração diária de 20 gr de inulina para 12 homens com moderada hipercolesterolemia durante três semanas e observaram uma maior flatulência, como resultado da maior fermentação microbiana, além de redução nos níveis de triglicérides séricos, entretanto, o peso das fezes e pH, trânsito intestinal e níveis de glicose sanguíneos não foram afetados pelo tratamento.

De acordo com Roberfroid (2000) para justificar as alegações de redução de risco de doenças, a maioria das informações disponíveis necessitam serem confirmadas em humanos através de estudos envolvendo nutrição.

Oligofrutose é o nome comum dado apenas a oligômeros de frutose que são compostos de 1-kestose (GF₂), nistose (Gf₃) e frutofuranosil nistose (GF₄), em que as unidades de frutossil (F) são ligadas na posição β 1-2, da sacarose, o que os distingue de outros oligômeros (PASSOS; PARK, 2000).

A utilização de oligofrutose quando fornecida a humanos em baixas dosagens (5 g/dia) quando comparada ao placebo (sacarose) foi avaliada por Rao (2001) sendo constatado diferenças significativas nas contagens de bifidobactérias, anaeróbios totais e bacteróides. Verificou-se maiores contagens no grupo que recebeu oligossacarídeo com

diminuição de coliformes; entretanto não houve diferença nas contagens de aeróbios totais. Entretanto, Wang e Gibson (1993) encontraram um aumento no crescimento de *E. coli* na presença de oligofrutose.

A utilização de carboidratos no cólon resulta na produção de acetato, propionato e butirato na proporção de 55:20:15. Entretanto, Sghir, Chow e Mackie (1998) verificaram que o crescimento em cultura contínua com inóculo proveniente de fezes humanas, utilizando-se FOS como única fonte de carbono e energia, a produção foi quase que exclusivamente de acetato e lactato, deduzindo que esta cultura poderia consistir basicamente de bifidobactérias e/ou lactobacilos, os quais produzem preferencialmente estes ácidos orgânicos.

Neste mesmo experimento, verificou-se somente uma pequena modificação nas contagens de bifidobactérias devido ao fato de que o pH da cultura contínua ter variado entre 5,2 e 5,5, pois o pH para o ótimo crescimento destas bactérias deve oscilar entre 6,5 e 7,0, sendo, portanto, incapazes de crescerem em pH menor que 5,0. Bacteróides e bifidobactérias não foram detectadas três dias após o início do experimento, e lactobacilos (42% da população total) e provavelmente outras bactérias lácticas tornaram-se predominantes. Entretanto, sob condições controladas, as bifidobactérias crescem mais rapidamente do que lactobacilos.

McBain e Macfarlane (2001) verificaram que a fermentação de inulina e GOS, em cultura contínua, ocorre principalmente no cólon proximal, sendo associado com a estimulação na população de lactobacilos (cerca de 10 vezes) ocorrendo um menor aumento de bifidobactérias. Entretanto, os níveis populacionais de peptostreptococci, enterococci e *Clostridium perfringens* também aumentaram. A utilização destes carboidratos estava associada com a síntese de nitroreductase e azoreductase e redução enzimática de α -glucosidase e β -glucuronidase.

O efeito bifidogênico da inulina não foi comprovado por Tuohy et al (2001) que verificaram apenas um pequeno aumento na população de bifidobactérias e lactobacilos quando este prebiótico foi fornecido a humanos durante 14 dias.

Um outro substrato com potencial de uso como prebiótico é a goma acácia, também conhecida como goma arábica, é originária do exudato da árvore acácia, sendo comumente usada como aditivo em alimentos. É definida pela farmacopéia como: “exudado gomoso, que ocorre naturalmente, obtido pela incisão de troncos e galhos da Acácia Senegal e outras espécies de Acácia de origem africana”.

Historicamente a goma acácia foi primeiramente usada pelos egípcios há mais 4000 anos atrás como adesivo para pigmentos minerais nas pinturas, cosméticos, tinta para escrever e nos panos utilizados como envoltórios no processo de mumificação. No uso terapêutico era empregada para aliviar irritações tópicas e proteger nos casos superficiais de escoriações, queimaduras e ulcerações (CAIUS; RADHA, 1942). Atualmente ela é amplamente usada na indústria de alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, explosivos, têxteis e nos processos de microencapsulação (Sánchez et al., 2002) de culturas probióticas visando a proteção destas bactérias durante secagem, armazenamento e trânsito gástrico (DESMOND et al., 2002).

Existem cerca de 700 tipos de Acácia, das quais poucas produzem gomas em volumes de interesse industrial. Após a colheita, a goma acácia é purificada por simples processo físico de centrifugação e filtração, sem que haja qualquer modificação química ou enzimática; após é esterilizada para garantir padrão microbiológico e finalmente obtém-se, através de processo de secagem por atomização (“spray-drying”) um produto em pó ou granulado altamente hidrossolúvel (CNI, 2000).

A goma acácia compreende uma cadeia altamente ramificada de polímeros de galactanos, com cadeias de galactose e/ou arabinose, possivelmente terminadas por resíduos de ramnose ou ácido glucurônico. Ela não é digerida no intestino delgado sendo, portanto, um substrato potencial para microflora do cólon. Esta goma parece ser altamente fermentada *in vivo* em humanos e ratos, e *in vitro* usando flora fecal de humanos e suínos. Entretanto, em alguns trabalhos observa-se baixa concentração de ácidos graxos voláteis quando fornecida a ratos. Estas diferenças podem ser devido à composição bioquímica das gomas e/ou tempo de administração (MICHEL et al., 1998). Tem sido sugerido que a adaptação da atividade de fermentação ocorre quando a duração da administração da goma é prolongada. (WYATT; BAYLISS; HOLCROFT, 1987).

Resistência bacteriana a antibióticos

Os critérios a serem levados em consideração para a seleção de microrganismos probióticos, segundo Saarela et al. (2000), incluem segurança, funcionalidade e aspectos tecnológicos. Em relação aos aspectos relacionados à segurança, estes incluem as seguintes especificações:

- as estirpes para uso humano devem ser preferencialmente de mesma origem;
- estas devem ser isoladas do trato gastrointestinal de pessoas saudáveis;

- não devem possuir histórico de patogenicidade;
- não deverão estar associadas a doenças como endocardite infecciosa ou a desordens do trato gastrointestinal;
- não devem desconjugar sais biliares (a desconjugação ou desidroxilação pode ser negativa no intestino delgado);
- não devem carrear genes transmissíveis de resistência a antibióticos, havendo a necessidade de testar cada estirpe.

Recentemente, tem sido dado ênfase ao alimento como sendo um veículo que pode carrear genes de resistência a antibióticos. Em geral, acredita-se que culturas starter possuem potencial para servirem como reservatório de tais genes com risco de transferência para bactérias patogênicas (BOWER e DAESCHEL, 1999).

Os lactobacilos são comuns em alimentos e são membros da microflora residente do trato gastrointestinal de humanos e de animais. Devido a sua ampla distribuição, são consideradas bactérias comensais e podem funcionar como um vetor de disseminação de resistência a antibióticos via cadeia alimentar para o consumidor (GEVERS; HUYS; SWINGS, 2003).

Quando uma determinada espécie de microrganismo é inicialmente sensível a um agente antimicrobiano, esta, pode adquirir resistência através de mutação espontânea ou através da aquisição de material genético a partir de bactérias resistentes pela transformação, transdução ou conjugação (TAN; TILLET; McKAY, 2000).

De acordo com Zhou et al. (2005) muitas bactérias lácticas (LAB) são resistentes a antibióticos e esta resistência é frequentemente intrínseca e não transmissível. Entretanto, algumas LAB que podem possuir genes de resistência codificados por plasmídeos como estirpes de *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. reuteri*. A transmissão de genes de resistência para espécies patogênicas ou potencialmente patogênicas no intestino deverá ser um critério levado em consideração na seleção e segurança de estirpes probióticas. Por outro lado, a resistência intrínseca de estirpes probióticas pode beneficiar pacientes cuja microbiota intestinal normal tenha sido desbalanceada ou drasticamente reduzida devido à administração de vários agentes antimicrobianos.

Entretanto, mudanças drásticas podem afetar a microflora intestinal normal pela administração de antibióticos terapêuticos, sendo o balanço microbiano alterado. Estas cepas de lactobacilos resistentes podem proteger efetivamente o equilíbrio natural da microflora intestinal durante e após a terapia com antibióticos, caso os isolados sejam comprovadamente resistentes. As cepas também podem ser úteis na produção de produtos

lácteos caso os antibióticos estejam presentes no leite, devido ao uso como promotor de crescimento ou na terapia de animais domésticos (XANTHOPOULOS; LITOPOULOU-TZANETAKI ; TZANETAKIS, 2000).

O objetivo deste trabalho foi verificar se os isolados selecionados, L4, L5, L12, L19, L20, L22, L23 e L24 utilizam alguns substratos considerados prebióticos como oligofrutose, inulina e goma acácia, assim como determinar sua resistência aos antibióticos normalmente usados na terapia humana.

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica, da Universidade Estadual de Londrina e da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, respectivamente. Os isolados testados foram selecionados de acordo com a capacidade de resistir à presença de sais biliares, acidez e fenol.

Crescimento “in vitro” de isolados de *Lactobacillus* spp em inulina, oligofrutose e goma acácia

Neste experimento, foi utilizado o caldo MRS isento de glicose e extrato de carne adicionado de 1% de oligofrutose, inulina ou goma arábica. A oligofrutose e inulina são fabricadas pela Orafiti (nome comercial Raftilose ® e Raftiline ®) sendo obtidas industrialmente por extração com água quente das raízes de chicória frescas. A goma arábica (Fibregum ®) foi gentilmente doada pela empresa Colloides Naturels Brasil. O caldo foi distribuído em tubos de ensaio contendo tubos de Durhan invertidos sendo esterilizados a 121°C por 15 minutos. As culturas a serem testadas foram anteriormente estriadas em ágar MRS e as colônias isoladas diluídas em água estéril para obtenção de uma suspensão homogênea. À partir desta solução, os tubos contendo os prebióticos foram inoculados a 1% (v/v), sendo incubados a 37°C por 24 horas (HATERMINK et al., 1997 e GARCIA, 1999). As amostras foram plaqueadas em ágar MRS logo após a inoculação nos respectivos caldos e também posteriormente ao período de incubação.

Antibiograma

Os isolados foram confrontados com antibióticos comumente utilizados na terapia em humanos, sendo utilizada a cultura comercial probiótica liofilizada de *L. acidophilus* (La-5TM) como padrão. Empregou-se o método de difusão em placa, onde após ativação das culturas foram feitas estrias em ágar MRS, sendo as células removidas da superfície com solução salina. As suspensões celulares (0,5 na escala McFarland) foram inoculadas em ágar MRS, sendo adicionado os discos impregnados com os seguintes antibióticos: penicilina G (10UI), tetraciclina (30 mcg), eritromicina (15 mcg), cloranfenicol (30 mcg), estreptomicina (10 mcg). Consultou-se a tabela “Laborclin” ® para a interpretação do halo de inibição, sendo que os testes foram realizados em triplicatas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento “*in vitro*” de isolados de *Lactobacillus* spp em inulina, oligofrutose e goma acácia

Os resultados dos plaqueamentos em ágar MRS dos oito isolados selecionados nos substratos prebióticos no tempo 0, logo após a inoculação, e no tempo 24 horas estão na Tabela 1 e 2. A Tabela 3 mostra os resultados (em delta) decorrentes deste intervalo avaliado.

Tabela 1: Contagem dos isolados em caldo MRS acrescido de 1% de oligofrutose, inulina ou goma acácia no Tempo 0.

Isolados	Prebióticos			
	MRS normal	MRS + oligofrutose	MRS + inulina	MRS + Goma acácia
L4	5,81	5,69	5,78	5,68
L5	5,99	5,97	5,99	5,87
L12	6,89	6,79	6,72	6,71
L22	6,66	6,65	6,55	6,65
L19	5,82	5,95	6,02	5,96
L20	5,46	5,40	5,37	5,29
L23	6,05	5,99	6,04	5,98
L24	5,60	5,58	5,65	5,70

Valores expressos em Log (UFC/ml).

Tabela 2: Contagem dos isolados em caldo MRS acrescido de 1% de oligofrutose, inulina ou goma acácia no Tempo 24 horas.

Isolados	Prebióticos			
	MRS normal	MRS + oligofrutose	MRS + inulina	MRS + Goma acácia
L4	8,87	8,46	8,50	8,48
L5	8,97	8,54	8,56	8,84
L12	8,91	8,47	8,60	8,60
L22	8,73	8,73	8,66	8,35
L19	9,57	8,80	8,72	8,49
L20	8,56	8,63	8,63	8,41
L23	9,14	8,48	8,48	8,24
L24	9,76	8,81	8,75	8,32

Valores expressos em Log (UFC/ml).

Tabela 3: Valores, expressos em log, dos plaqueamentos nos tempos 0 e 24 horas (T0 - T24) utilizando diferentes oligossacarídeos.

Isolado	Prebióticos			
	MRS normal	MRS + oligofrutose	MRS + inulina	MRS + Goma acácia
L5	2,98 ^a	2,57 ^b	2,57 ^b	2,66 ^b
L19	4,11 ^a	3,23 ^b	3,26 ^b	3,12 ^b
L20	3,77 ^a	2,84 ^b	2,72 ^{b,c}	2,53 ^c
L22	2,07 ^a	2,07 ^a	2,11 ^a	1,69 ^b
L23	3,08 ^a	2,49 ^b	2,44 ^b	2,26 ^b
L24	4,15 ^a	3,23 ^b	3,10 ^b	2,60 ^c

Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Student Neuman Keuls a 5% de probabilidade.

Através dos resultados obtidos, verificou-se que todos os isolados apresentaram crescimento nos caldos analisados sem produzir gás.

Houve diferença significativa entre os diferentes isolados com relação a utilização dos substratos avaliados. Os isolados que apresentaram maior crescimento no caldo controle foram L5, L19, L20, L23 e L24. Para o isolado L24 os tratamentos, inulina e oligofrutose, não diferiram estatisticamente. Verificou-se resultado semelhante para o isolado

L20, entretanto, as médias para inulina e goma acácia foram estatisticamente semelhantes. Para o isolado L22 os tratamentos não diferiram estatisticamente, exceto o tratamento goma acácia.

Bagatini (2002) avaliando o crescimento de *L. acidophilus* em caldo MRS acrescido de Raftilose (oligofrutose), após 24 horas de incubação, obteve uma maior contagem, que foi de $1,0 \times 10^9$ ufc/ml, quando comparado aos isolados testados neste experimento.

Mitchel et al. (1998) avaliaram a fermentabilidade *in vitro* de goma acácia sendo utilizada fezes de voluntários humanos saudáveis adicionada de duas fontes de goma acácia além de frutoligossacarídeos. Os autores constataram que a contagem de bactérias lácticas aumentou 6,75 vezes, sendo que *Lactobacillus ssp* apresentou um aumento de 1,8 ciclos logarítmicos em pH 6,5 e o número de clostrídios diminuiu (pH 5,8) quando comparado ao controle.

Ainda segundo os referidos autores, o crescimento de bactérias lácticas foi favorecido pelo aumento de 1,2 ciclos logarítmicos quando foi adicionado FOS, ocorrendo um aumento similar em *Lactobacillus ssp*. Observou-se variação na produção de butirato, com efeito butirogênico de uma das fontes de goma em pH 5,8; sendo que o pH afetou a produção de butirato somente em presença de FOS, uma vez que este substrato pode ser fermentado por *Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus sp*, *Streptococcus sp*, *Bacteroides sp*, *Clostridium sp* e algumas enterobactérias. Em condições ácidas, o desenvolvimento das bactérias lácticas poderia ser favorecido permitindo estes microrganismos competir com outros fermentadores de FOS.

Bourquin, Titgemeyer e Faltey (1996) também verificaram que goma acácia foi extensivamente fermentada “*in vitro*” por bactérias provenientes de três amostras fecais e que a produção de ácidos graxos voláteis foi maior neste substrato, quando comparado à pectina de citrus.

Fooks e Gibson (2002) constataram o crescimento de *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. reuteri* e *L. acidophilus* em caldo MRS adicionado de 1% de oligofrutose, XOS, lactulose, lactitol, amido e dextrano, sendo verificado o crescimento através de densidade óptica por 24 horas. Os autores observaram que a maior taxa de crescimento foi obtida quando o meio continha glicose como fonte de carbono e energia, oligofrutose, xilo oligossacarídeos (XOS) e sua combinação, sendo estes fermentados preferencialmente em relação aos demais substratos. Verificou-se que *L. plantarum* cresceu mais rapidamente

quando comparado às outras espécies de lactobacilos, independente da fonte de carboidrato utilizada.

Brink et al. (2003) avaliaram a densidade óptica, após 24 horas, de estirpes probióticas de lactobacilos que cresceram em raftilose, raftiline e synergy 1 (inulina + oligofrutose) e verificaram que o melhor substrato foi a combinação de ambos oligossacarídeos. Entretanto, ao compararmos inulina e oligofrutose foram obtidos os seguintes valores, em d.o.: *L. plantarum* (0,058 e 0,048); *L. casei* 241 (1,287 e 1,033) e *L. pentaceus* (1,077 e 0,942) que portanto, cresceram melhor em inulina e *L. curvatus* (0,918 e 0,922) e *L. casei* (1,029 e 1,70) cresceram melhor em raftilose.

O estudo do crescimento de lactobacilos na presença de inulina foi verificado em um sistema simulador do ecossistema microbiano humano (SHIME), adicionando-se 2,5 g do prebiótico. Houve aumento na concentração de lactobacilos e de bifidobactérias no cólon na primeira semana, sendo estes valores significativos somente após a segunda semana. A população de lactobacilos foi equivalente a 1,5 ciclo logarítimo mais alta no cólon ascendente e transversal, quando comparada ao início do experimento. Ao se comparar a adição de inulina ao tratamento controle, foram obtidos os maiores valores, em logarítimo, para o tratamento contendo inulina no cólon transversal (6,91) quando comparado ao controle que foi de 6,48. (WIELE ; BOON; POSSEMIERS, 2004).

Antibiograma

Verificou-se, de acordo com a Tabela 4, sensibilidade de todos os isolados ao cloranfenicol e a tetraciclina (exceto L20 e L24) e resistência à estreptomina, exceto a estirpe padrão (*L. acidophilus*) que se mostrou sensível aos cinco antibióticos testados.

Tabela 4: Diâmetro do halo de inibição resultante da sensibilidade dos isolados a diferentes antibióticos (mm).

Isolado	Antibiótico				
	Penicilina (10UI)	Tetraciclina (30 mcg)	Eritromicina (15 mcg)	Cloranfenicol (30 mcg)	Estreptomicina (10 mcg)
L4	34,0 ± 0,0 S	33,0 ± 2,0 S	12,0 ± 0,0 R	30,0 ± 1,0 S	8,0 ± 2,51 R
L5	33,0 ± 2,30 S	35,0 ± 1,0 S	10,0 ± 0,57 R	30,0 ± 0,0 S	7,0 ± 1,15 R
L12	27,0 ± 1,52 I	36,0 ± 0,57 S	12,0 ± 0,57 R	28,0 ± 1,73 S	7,0 ± 0,0 R
L19	23,0 ± 2,30 I	23,0 ± 3,05 S	35,0 ± 2,51 S	34,0 ± 1,52 S	6,0 ± 1,0 R
L20	17,0 ± 5,77 R	17,0 ± 3,6 I	35,0 ± 1,0 S	34,0 ± 3,21 S	6,0 ± 1,0 R
L22	25,0 ± 2,3 I	19,0 ± 3,05 S	36,0 ± 1,73 S	33,0 ± 1,15 S	6,0 ± 1,0 R
L23	22,0 ± 3,46 I	19,0 ± 2,64 S	35,0 ± 0,57 S	30,0 ± 1,0 S	6,0 ± 1,0 R
L24	20,0 ± 1,73 I	17,0 ± 1,0 I	34,0 ± 2,0 S	31,0 ± 3,46 S	6,0 ± 0,0 R
<i>L. acidophilus</i>	29,0 ± 3,00 S	27,0 ± 1,15 S	63,0 ± 4,16 S	41,0 ± 9,01 S	23,0 ± 3,05 S

S- sensível I- Intermediário R- Resistente

Na foto1 está representado o antibiograma dos isolados L24, L5, L12, L23 e

L22.

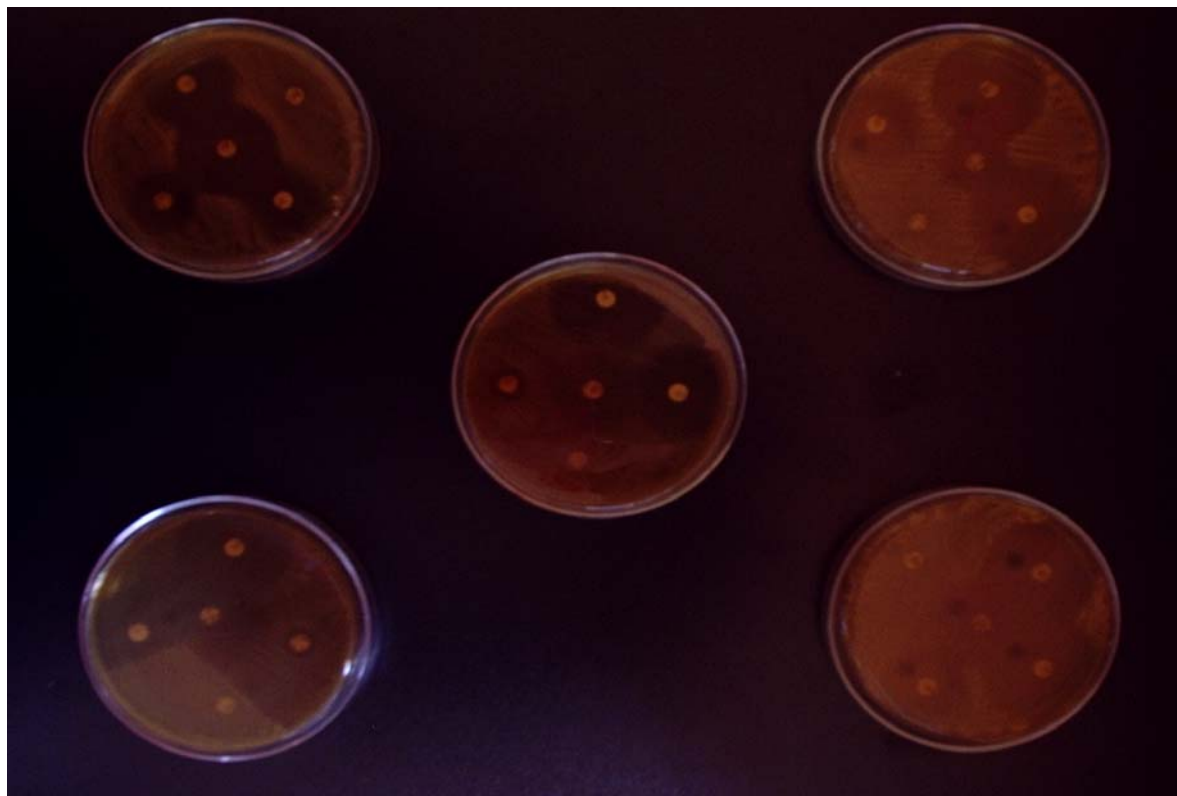


Figura 1: Antibiograma dos isolados selecionados L24, L5, L12, L23 e L22.

Resultados similares foram obtidos por Paulo (1991) e por Neumann e Ferreira (1995), que constataram sensibilidade dos lactobacilos isolados ao cloranfenicol. Cebici e Gurakan (2003) também verificaram que isolados de *L. plantarum* variaram com relação à sensibilidade ou resistência aos antibióticos testados, sendo a maioria das estirpes consideradas de sensibilidade intermediária a penicilina, resistentes a tetraciclina e sensíveis a eritromicina.

Ronka, Malinen e Saarela (2003) testaram a susceptibilidade de duas estirpes de *L. brevis* a antibióticos, constatando que ambas foram resistentes à penicilina e sensíveis ao cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina.

Arici et al. (2004) também constataram a resistência dos lactobacilos isolados de fezes de crianças à estreptomicina e sensibilidade ao cloranfenicol, eritromicina, penicilina G e tetraciclina.

Xanthopoulos, Litopoulo-Tanetaki e Tzanetakis (2000) constataram que as estirpes de lactobacilos isoladas de crianças foram sensíveis à maioria dos antibióticos testados, como cloranfenicol, eritromicina, penicilina G e tetraciclina; embora as dosagens

dos antibióticos avaliados tenham sido maiores em relação às utilizadas neste experimento.

A determinação da resistência ou susceptibilidade de estirpes de lactobacilos a antibióticos é importante, pois, estirpes que mostram resistência a um antibiótico específico, podem ser fornecidas juntamente com este antibiótico durante uma reposição de flora, permitindo a obtenção mais rápida de resultados.

Entretanto, segundo Gevers, Geert e Swings (2003), estirpes de lactobacilos que tenham genes de resistência, podem funcionar como vetores para a disseminação destes genes via cadeia alimentar para o consumidor. Os referidos autores verificaram que de 14 estirpes de lactobacilos isoladas de salsicha que continham o gene de resistência à tetraciclina *tet* (M), sete isolados foram capazes de transmitir, *in vitro*, via conjugação, esta resistência para *Enterococcus faecalis* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, não sendo evidenciado esta transferência para *Staphylococcus aureus*, concluindo que lactobacilos isolados de produtos contendo carne poderiam se tornar reservatório de tais genes disseminando-os para outras bactérias lácticas. Embora os plasmídios sejam muito comuns em lactobacilos existem poucos dados na literatura sobre sua transferência via conjugação.

Zhou et al. (2005) testaram as seguintes estirpes probióticas *L. rhamnosus* HN001 e HN067, *L. acidophilus* HN017 e *B. lactis* HN019 com relação à susceptibilidade a vários antibióticos e presença de plasmídeos e verificaram que tais bactérias foram susceptíveis aos antibióticos β lactâmicos (penicilina, ampicilina e cefalotina) antibióticos de espectro Gram positivo (eritromicina e novobiocina) e de amplo espectro (cloranfenicol, rifampicina, espinomicina e tetraciclina) e resistentes a antibióticos de espectro gram negativo (ácido fusídico, ácido nalidíxico e polimixina B), aos aminoglicosídicos (gentamicina, canamicina, neomicina e estreptomina) e a vancomicina. Constatou-se ainda a ausência de plasmídeo nas bactérias testadas, inclusive em *Lactobacillus* GG, usada como referência.

A ausência de plasmídios em *L. rhamnosus* GG também foi observada por Tynkkynen, Savindra e Varmanen (1998) que também verificaram este microrganismo não foi capaz de transmitir genes de resistência a vancomicina (*van*) para *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*. Os autores ressaltam ainda que muitas espécies de lactobacilos que possuem resistência intrínseca a vancomicina são utilizadas há muito tempo na indústria e podem ser consideradas seguras, como por exemplo, *L. rhamnosus* e *L. casei*, que são intrinsecamente resistentes a vancomicina, consideradas seguras, não havendo indícios de transferência de resistência para outras bactérias.

Danielsen e Wind (2003) avaliaram a susceptibilidade de 62 estirpes de lactobacilos a 25 agentes antimicrobianos e concluíram que o nível de susceptibilidade a estas substâncias é espécie dependente.

Kastner et al. (artigo no prelo) avaliaram a resistência de 200 cepas probióticas e culturas “starters” como *Lactobacillus* (74 amostras), *Staphylococcus* (33 amostras), *Bifidobacterium* (6 amostras), *Pediococcus* (5 amostras) e lactococci e streptococci (82 amostras) a 20 antibióticos. Vinte e sete isolados exibiram resistência; sendo que em um isolado foi verificada a resistência a 15 antibióticos (*L. reuteri* SD 2112), porém a média do número de resistência fenotípica das 74 amostras de lactobacilos foi de 5-6, incluindo ambos tipos de resistência, intrínseca e adquirida. Foram encontrados também genes de resistência à tetraciclina em cinco estirpes de *Staphylococcus*, sendo estas usadas como cultura starter para carne, além de culturas probióticas como *B. lactis* DSM 10140 e *L. reuteri* SD 2112 (gene presente no plasmídio) e resistência a lincosamida em *L. reuteri* SD2112.

4 CONCLUSÃO

Os isolados testados podem ser usados em produtos simbióticos contendo oligofrutose, inulina ou goma arábica, pois são capazes de utilizar estes substratos. Todos os isolados foram resistentes ao antibiótico estreptomicina, entretanto não se determinou a presença de plasmídeos para a verificação da transmissão desta resistência.

REFERENCIAS

ARICI, M.; BILGIN, B.; SAGDIG, O.; OZDEMIR, C. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. **Food Microbiology**, London, v. 21, p. 19-24, 2004.

BAGATINI, L. **Desenvolvimento de um suplemento alimentar geriátrico**. 2002. 66p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos e Medicamentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BOURQUIN, L.D.; TITGEMEYER, E.; FAHEY, G. Fermentation of various dietary fiber sources by human fecal bacteria. **Nutrition Research**, Tarrytown, Ny, US, v. 16, n.7, p.1119-1131, 1996.

BOWER, C.K. e DAESCHEL, M.A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.50, p. 33-44, 1999.

BRINK, M.; FRASER, T.; TODOROV, S.D.; VAZ-VELHO, M.; SENEKAL, M.; DICKS, L.M.T.. A combined use of probiotics and prebiotics in a soymilk based food supplement aimed at improving the gastrointestinal flora of children with HIV aids. **Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 504-509, 2003.

CAIUS, J.F.; RADNA, K.S. The gum arabic of the bazaars and shops of Bombay. **Journal of Bombay Natural of Story Society**, v. 41, p. 261-271, 1942.

CAUSEY, J.L.; FEIRTAG, J.M.; GALLATUR, D.D.; TUNGLAND, B.C.; SLAVIN, J.L. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal in hypercholesterolemic men. **Nutrition Research**, Tarrytown, Ny, US, v. 20, n.2, p. 191-201, 2000.

CEBICI, A.; GÜRAKAN, C. Properties of potencial probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **Food Microbiology**, London, v. 20, p.511-518, 2003.

COLLOIDES NATURELS INTERNATIONAL **Fibregum**: Uma fibra dietética solúvel. São Paulo:Colloides Naturels Brasil Comercial, 2000. 13p.

COLLINS, M.D.; GIBSON, G. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 69 (suppl), p. 1052S-7S, 1999.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. A review the control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.70, p. 443-459, 2001.

DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus ssp.* to antimicrobial agents. **International Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, p. 1-11, 2003.

DESMOND, C.; ROSS, R.P.; O'CALLAGHAN, E.; FITZGERALD, G.; SANTON, C. Improved survival of *L. paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, p. 1003-1011, 2002.

FOOKS, L.J.; GIBSON, G.R. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 39, p. 67-75, 2002.

GARCIA, S. **Isolamento e caracterização de bactérias lácticas para uso como probiótico.** 1999. 156 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos e Medicamentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina..

GEVERS, D.; GEERT, H.; SWINGS, J. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, 225, p. 125-130, 2003.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concepts of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GORBACH, S.L.; GOLDIN, B.R. Nutrition and the gastrointestinal microflora. **Nutrition Reviews**, New York, v. 50, p.378-381, 1992.

HATERMINK, R.; VAN LAERE; K.M.J.; ROMBOUTS, F.M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosacharides. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 83, p. 367-374, 1997.

HAVENAAR, R.; BONNIN-MAROL, S.; VAN DOKKUM, W.; PETITET, S.; SCHAAF SMA, G. Inulin: fermentation and microbial ecology in the intestinal tract. **Food Research International**, Barking, v. 15, n. 1, p. 109-120, 1999.

KASTNER, S.; PERRETEN, V.; BLEULER, H.; HUNGENSCHIMIDT, G.; LACROIX, C.; MEILE, L. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart. 2006. (no prelo).

LABORCLIN. **Testes de susceptibilidade a Antibacterianos: Antibiograma.** Pinhais, Paraná: [s.n., 19--]

MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **British Medical Journal**, London, v. 318, p.999-1003. 1999.

MCBAIN, A.J.; MACFARLANE, G.T. Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharide metabolism in in-vitro human gut bacterial ecosystems. **Journal of the Society for General Microbiology**, v. 50, p.833-842, 2001.

MICHEL, C.; KRAVTCHENKO, T.P.; DAVID, A. In vitro prebiotic effects of Acacia gums onto the human intestinal microbiota depends on both botanical origin and environmental pH. **Anaerobe**, v. 4, p.257-266, 1998.

NEUMANN, E.; FERREIRA, C.L.L.F. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct: “in vitro” susceptibility to gastric juice, bile salts, lysozyme and chemotherapeutic agents. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n.1, p. 59-65, 1995.

ORBAN, J. I.; PATTERSON, J. A.; SUTTON, A., L. Effect of sucrose thermal oligosaccharide caramel, dietary vitamin-mineral level and brooding temperature on growth and intestinal bacterial population of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, Ill, v. 76, n.3, p. 482-490, 1997.

OUWEHAND, A.C.; DERRIEN, M.; de VOS, W.; TIHONEM, K.; RAUTONEN, N. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.16, p. 212-217, 2005.

PAULO, E.M. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de suínos para uso como probiótico.** 1991. 73 p. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.2, p. 385-390, 2000.

RAO, A.V. The probiotic properties of oligofructose at low intake levels. **Nutrition Research**, Torrytown, Ny, US, v. 21, p. 843-848, 2001.

RASTALL, R.A.; GIBSON, G.R.; GILL, S.H.; GUARNER, F.; KLAENHAMMER, T.R.; POT, B.; REID, G.; ROWLAND, I.R.; SANDERS, M.E. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and symbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 52, p. 145-152, 2005.

RONKA, E.; MALINEN, E.; SAARELA, M. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, p.63-74, 2003.

ROBERFROID, M.B.; DELENNE, N.M. Dietary fructans. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, Calif., v. 18, p. 17-43, 1998.

ROBERFROID, M. Prebiotics and Probiotics: are they functional foods? **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.71, n.6, 2000.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.84, p. 197-215, 2000.

SALYERS, A.A.; LEEDLE, J.A.Z. Carbohydrate utilization in the human colon. In: Hentges, D.J. (Ed.) **Human intestinal microflora in health and disease**. London:Academic Press, 1983.

SÁNCHEZ, C.; RENARD, D.; ROBERT, P.; SCHIMITT, C.; LEFEBVRE, J. Structure and rheological properties of acacia gum dispersions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 16, p. 257-267, 2002.

SGHIR, A, CHOW, J. M.; MACKIE, R. I. Continuous culture selection of bifidobacteria and lactobacilli from human faecal samples using fructooligosaccharides as selective substrate. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.85, p. 769-777, 1998.

SULLIVAN, M. G. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora – na overview. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, . p. 23-29, 1996.

TAN, YU-TING; TILLET, D.; McKAY, I.A. Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. **Molecular Medicine Today**, v.6, p. 309-341, 2000.

TYNKKYNEN, S.; KAVINDRA, V.S.; VARMANEN, P. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, p. 195-204, 1998.

TUOHY, K.M.; FINLAY, R.K.; WYNNE, A.G.; GIBSON, G.R. A human volunteer study on the prebiotic effects of HP-Inulin- faecal bacteria enumerated using fluorescent in situ hybridization. **Anaerobe**, v.7, p.113 - 118, 2001.

WALKER, W. A.; DUFFY, L.C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. **Journal Nutrition Biochem.**, v.9, p. 668-675, 1998.

WANG, X.; GIBSON, G.R. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, p. 373-389, 1993.

WIELE, T.V.; BOON, N.E.; POSSEMIERS, S. Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, p. 143-153, 2004.

WYATT, G.M.; BAYLISS, C.E.; HOLCROFT, J.D. A change in human faecal flora in response to inclusion of gum Arabic in the diet. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.117, p.1556-1561, 1987.

XANTHOPOULOS, V.; LITOPOULOU-TANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. **Food Microbiology**, London, v. 17, p.205-215, 2000.

ZHOU, J.S.; PILLIDGE, C.J.; GOPAL, P.K.; GILL, H.S. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, p.211-217, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1:
CAPÍTULO 1

Product Description

Before submitting an order you will be asked to read and accept the terms and conditions of ATCC's [Material Transfer Agreement](#) or, in certain cases, an MTA specified by the depositing institution.

Customers in Europe, Australia, Hong Kong, India, Japan, Korea, New Zealand, Singapore and Taiwan, R.O.C. must contact a [local distributor](#) for pricing information and to place an order for ATCC cultures and products.

Bacteria

ATCC® Number: 7469™

[Preceptrol® Culture](#)

Organism: *Lactobacillus rhamnosus* (Hansen) Collins et al.; deposited as *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen) Holland

Designations: [BUCSAV 227; M. Rogosa V300; M.E. Sharpe H2; NCDO 243; NCIB 6375; NCIB 8010; NCTC 6375; NRC 488; P.A. Hansen 300; R.P. Tittsler 300]

Depositor: FM Strong

[Biosafety Level](#): 1 Shipped: freeze-dried
 Growth Conditions: [ATCC medium 416](#): Lactobacilli MRS broth
 Temperature: 37.0C

Permits/Forms: In addition to the [MTA](#) mentioned above, other ATCC and/or regulatory permits may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please [click here](#) for information regarding the specific requirements for shipment to your location.

[Related Products](#)

Cross References: GenBank: [AF192553](#): *Lactobacillus rhamnosus* dlt operon, complete sequence.
 GenBank: [L08854](#): *Lactobacillus casei* valyl-tRNA synthetase gene, complete cds.
 GenBank: [J05221](#): *L.carei* folylpoly-gamma-glutamate synthetase gene, complete cds.
 GenBank: [AF323539](#): *Lactobacillus rhamnosus* strain ATCC [7469](#) glycosyltransferase gene, partial cds.
 GenBank: [AF323528](#): *Lactobacillus rhamnosus* strain ATCC [7469](#) priming glycosyltransferase gene, partial cds.
 GenBank: [U43894](#): *Lactobacillus casei* dlt operon DltA, DltB, and DltC genes, complete cds, and DltD gene, partial cds.
 GenBank: [M83993](#): *Lactobacillus casei* D-alanine-activating enzyme gene, complete cds and a potential basic membrane protein (involved in D-alanine biosynthesis) gene, 5' end.

GenBank: [AF015453](#): Lactobacillus rhamnosus 6-phospho-beta-glucosidase homolog gene, partial cds; GNTR transcriptional regulator homolog and surface located protein genes, complete cds.

- Type Strain: yes [[8852](#)] [[11168](#)] [[36887](#)]
 respiratory physiology [[8192](#)]
- Comments: extraction of acidic metabolites [[9675](#)]
 pyruvate utilization [[8287](#)]
- Applications: produces folate transport protein [[689](#)]
 assay of folic acid [[21480](#)] [[21498](#)] [[45889](#)] [[92289](#)] [[92291](#)]
 assay of niacinamide (nicotinamide)
 assay of riboflavin (vitamin B2)
- References: 689: Henderson GB, et al. Kinetic evidence for two interconvertible forms of the folate transport protein from Lactobacillus casei. J. Bacteriol. 163: 1147-1152, 1985. PubMed: [3928596](#)
 5417: Colwell RR, Liston J . Taxonomic relationships among the pseudomonads. J. Bacteriol. 82: 1-14, 1961. PubMed: [13694873](#)
 5552: Biochem. J. 69: 403, 1958.
 5561: Biochim. Biophys. Acta 54: 614, 1961.
 5562: Biochim. Biophys. Acta 59: 273, 1962.
 5570: Biochim. Biophys. Acta 71: 454, 1963.
 5713: Ikawa M. Nature of the lipids of some lactic acid bacteria. J. Bacteriol. 85: 772-781, 1963. PubMed: [14044942](#)
 5748: Sharpe ME. A serological classification of lactobacilli. J. Gen. Microbiol. 12: 107-122, 1955. PubMed: [14354139](#)
 5749: Davis GH. The classification of Lactobacilli from the human mouth. J. Gen. Microbiol. 13: 481-493, 1955. PubMed: [13278499](#)

Product Description

Before submitting an order you will be asked to read and accept the terms and conditions of ATCC's [Material Transfer Agreement](#) or, in certain cases, an MTA specified by the depositing institution.

Customers in Europe, Australia, Hong Kong, India, Japan, Korea, New Zealand, Singapore and Taiwan, R.O.C. must contact a [local distributor](#) for pricing information and to place an order for ATCC cultures and products.

Bacteria

ATCC[®] Number: 367[™]

Organism: *Lactobacillus brevis* (Orla-Jensen) Bergey et al.; deposited as *Lactobacillus pentoaceticus* Fred et al.

Designations: [118-8; BUCSAV 252; NCDO 477; NCIB 8169; NCIB 947; NCTC 947]

Depositor: EB Fred

[Biosafety Level](#): 1 Shipped: freeze-dried

Growth [ATCC medium 416](#): Lactobacilli MRS broth
Conditions: Temperature: 30.0C

Permits/Forms: In addition to the [MTA](#) mentioned above, other ATCC and/or regulatory permits may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please [click here](#) for information regarding the specific requirements for shipment to your location.

[Related Products](#)

Comments: This is an original strain of *L. pentoaceticus*

Applications: assay of cytosine [[46017](#)]
assay of uracil [[46017](#)]

References: 5730: Fred EB, et al. Acid fermentation of xylose. J. Biol. Chem. 39: 347-384, 1919.
5731: J. Biol. Chem. 42: 175, 1920.
5748: Sharpe ME. A serological classification of lactobacilli. J. Gen. Microbiol. 12: 107-122, 1955. PubMed: [14354139](#)
5749: Davis GH. The classification of Lactobacilli from the human mouth. J. Gen. Microbiol. 13: 481-493, 1955. PubMed: [13278499](#)
6072: J. Appl. Bacteriol. 18: 274, 1955.
6413: Davis JG. A comparison on the growth activating effects on Streptococcus and Lactobacillus of various yeast preparations. J. Pathol. Bacteriol. 45: 367-376, 1937.
8185: Can. J. Microbiol. 11: 319-324, 1965.
46017: Merrifield RB, Dunn MS. Microbiological determination of cytosine, uracil and thymine. Arch. Biochem. 16: 339-341, 1948.

[Notices and Disclaimers](#)

ATCC products are intended for laboratory research purposes only. They are not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this site, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate. All prices are listed in U.S. dollars and are subject to change without notice. A discount off the current list price will be applied to most cultures for nonprofit institutions in the United States and Canada. Cultures that are ordered as test tubes or flasks will carry an additional laboratory fee. Fees for permits, shipping, and handling may apply.

Product Description

Before submitting an order you will be asked to read and accept the terms and conditions of ATCC's [Material Transfer Agreement](#) or, in certain cases, an MTA specified by the depositing institution.

Customers in Europe, Australia, Hong Kong, India, Japan, Korea, New Zealand, Singapore and Taiwan, R.O.C. must contact a [local distributor](#) for pricing information and to place an order for ATCC cultures and products.

Bacteria

ATCC[®] Number: 9338[™]

[Preceptrol[®] Culture](#)

Organism: *Lactobacillus fermentum* Beijerinck

Designations: 36 [BUCSAV 233; NCDO 215; NCIB 6991; NCIB 8028; NCTC 6991]

Depositor: HP Sarett

History: ATCC<<--HP Sarett
<<--W. Peterson

[Biosafety Level](#): 1

Shipped: freeze-dried

Growth [ATCC medium 416](#):

Lactobacilli MRS broth

Conditions: Temperature: 37.0C

Permits/Forms: In addition to the [MTA](#) mentioned above, other ATCC and/or regulatory permits may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please [click here](#) for information regarding the specific requirements for shipment to your location.

[Related Products](#)

Cross

References: GenBank: [X74860](#): L.fermentum repA and repB genes.

Applications: assay of alanine (L-alanine) [[58585](#)]
 assay of histidine (L-histidine) [[45889](#)] [[58585](#)]
 assay of pyriothiamine [[58733](#)]
 assay of thiamine (vitamin B1) [[45889](#)] [[58585](#)]

5617: Appl. Microbiol. 1: 311, 1959.
 5748: Sharpe ME. A serological classification of lactobacilli. J. Gen. Microbiol. 12: 107-122, 1955. PubMed: [14354139](#)
 5749: Davis GH. The classification of Lactobacilli from the human mouth. J. Gen. Microbiol. 13: 481-493, 1955. PubMed: [13278499](#)
 6072: J. Appl. Bacteriol. 18: 274, 1955.
 6125: J. Biol. Chem. 155: 153, 1944.

References: 6175: Arch. Biochem. 16: 357-360, 1948.
 6770: Zentralbl. Bakteriolog., II Abt. 111: 250, 1958.
 45889: Girdwood RH. The microbiological assay of vitamins and amino acids. J. Med. Lab. Technol. 20: 26-33, 1963. PubMed: [13948188](#)

58585: Stiles HR, et al.. Fermentation products of certain mannitol-forming bacteria. J. Biol. Chem. 64: 643-654, 1925.
58733: Hagedorn H, Schmidt OR . Die Wirkung des antivitamin Pyriithiamin auf den Stoffwechsel der thiaminautotrophen *Serratia marcescens*. Arch. Microbiol. 103: 83-88, 1975. PubMed: [1100010](#)

Notices and Disclaimers ATCC products are intended for laboratory research purposes only. They are not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this site, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate. All prices are listed in U.S. dollars and are subject to change without notice. A discount off the current list price will be applied to most cultures for nonprofit institutions in the United States and Canada. Cultures that are ordered as test tubes or flasks will carry an additional laboratory fee. Fees for permits, shipping, and handling may apply.

Bacteria

ATCC[®] Number: 335[™]

Organism: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Collins et al.; deposited as *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen) Hansen and Lessel

Designations: [NCDO 242; NCIB 4113; epsilon]

Depositor: LA Rogers History: ATCC<<--LA Rogers <<-- Fender

[Biosafety Level](#): 1 Shipped: freeze-dried

Growth [ATCC medium 416](#): Lactobacilli MRS broth
Conditions: Temperature: 37.0C

Permits/Forms: In addition to the [MTA](#) mentioned above, other ATCC and/or regulatory permits may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please [click here](#) for information regarding the specific requirements for shipment to your location.

[Related Products](#)

Applications: assay of uracil of thymine

References: 46017: Merrifield RB, Dunn MS . Microbiological determination of cytosine, uracil and thymine. Arch. Biochem. 16: 339-341, 1948.

Product Description

Before submitting an order you will be asked to read and accept the terms and conditions of ATCC's [Material Transfer Agreement](#) or, in certain cases, an MTA specified by the depositing institution.

Customers in Europe, Australia, Hong Kong, India, Japan, Korea, New Zealand, Singapore and Taiwan, R.O.C. must contact a [local distributor](#) for pricing information and to place an order for ATCC cultures and products.

Bacteria

ATCC[®] Number: 8014[™]

Organism: *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) Bergey et al.; deposited as *Lactobacillus arabinosus* Fred et al.

Designations: 17-5 [BUCSAV 217; BUCSAV 449; Glaxo 664; ICPB 2080; NCDO 82; NCIB 6376; NCIB 8014; NCIB 8030]

Depositor: E McCoy

[Biosafety Level](#): 1

Shipped: freeze-dried

Growth Conditions: [ATCC medium 416](#); Lactobacilli MRS broth
Temperature: 37.0C

Permits/Forms: In addition to the [MTA](#) mentioned above, other ATCC and/or regulatory permits may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please [click here](#) for information regarding the specific requirements for shipment to your location.

[Related Products](#)

Cross References: GenBank: [X62346](#): L.plantarum plasmid 8014-2 DNA (from BcII to HincII site).

GenBank: [AF189765](#): Lactobacillus plantarum alpha-galactosidase (melA) gene, complete cds.

GenBank: [U97139](#): Lactobacillus plantarum 16S/23S ribosomal RNA large intergenic spacer region, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence.

GenBank: [X99978](#): Lactobacillus plantarum citrulline biosynthetic gene cluster (carAB operon and argC, J, B, D, F-ccl operon) and usg and dsq partial sequences.

Comments: each NCIB culture from a different depositor bacteriophage host accumulation of biotin [\[6553\]](#)
D-biotin conversion and metabolism [\[10275\]](#) [\[34645\]](#) [\[58634\]](#)
biotin transport and accumulation [\[11064\]](#) [\[34646\]](#)
formation of acetylmethylcarbinol [\[7469\]](#)
effect of pantothenate derivatives on growth and coenzyme-A synthesis [\[7301\]](#)
sulfur nutrition [\[6175\]](#) [\[7482\]](#)

nitrate reduction [\[6263\]](#)
 effect of oleic acid on free biotin uptake [\[7553\]](#)
 ribitol-5-phosphate dehydrogenase [\[7316\]](#)
 synthesis of ribitol teichoic acids [\[10745\]](#)
 energy-producing pathways [\[7540\]](#) [\[10737\]](#)
 DNA base composition (45.1 moles % GC) [\[9315\]](#)

Applications:

produces lactic acid from coconut water [\[58392\]](#)
 assay of amino acids [\[6665\]](#)
 assay of biotin [\[92233\]](#)
 assay of calcium pantothenate [\[21607\]](#) [\[92233\]](#)
 assay of niacinamide (nicotinamide) [\[21610\]](#)
 assay of nicotinic acid (niacin) [\[5216\]](#) [\[21480\]](#) [\[21610\]](#)
 assay of pantothenic acid [\[21480\]](#)
 assay of tryptophan (L-tryptophan)
 metabolizes mevalonic acid [\[7531\]](#)
 produces lactic acid (lactate) [\[58392\]](#)
 quality control strain [\[92408\]](#)

References:

5216: AACC. Niacin--microbiological method. St. Paul, MN: AACC International; AACC Method 86-51, 1999.
 6175: Arch. Biochem. 16: 357-360, 1948.
 6263: Costilow RN, Humphreys TW . Nitrate reduction by certain strains of *Lactobacillus plantarum*. Science 121: 168, 1955. PubMed: [13225760](#)
 6553: Lichstein HC, Waller JR . Factors affecting the accumulation of biotin by *Lactobacillus arabinosus*. J. Bacteriol. 81: 65-69, 1961. PubMed: [13761907](#)
 6665: AOAC International. Amino acids in vitamin preparations. Gaithersburg, MD: AOAC International; AOAC "Official Methods of Analysis of the AOAC International" 960.47.
 7301: Pierpoint WS, et al. The effect of some pantothenate derivatives on growth and coenzyme-A synthesis in bacteria. Biochem. J. 61: 190-197, 1955. PubMed: [13260197](#)
 7316: Biochim. Biophys. Acta 67: 525-530, 1963.
 7469: Moat AG, Lichstein HC . Factors affecting the formation of acetylmethylcarbinol by *Lactobacillus arabinosus*. J. Bacteriol. 66: 324-327, 1953. PubMed: [13096481](#)
 7482: Shiota T, Clark FM . Studies on the sulfur nutrition of *Lactobacillus arabinosus*. J. Bacteriol. 70: 339-344, 1955. PubMed: [13263295](#)
 7531: Durr IF, Shwayri AN . Metabolism of mevalonic acid by *Lactobacillus plantarum* . J. Bacteriol. 88: 361-366, 1964. PubMed: [14203352](#)
 7540: Oxenburgh MS, Snoswell AM . Use of molar growth yields for the evaluation of energy-producing pathways in *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. 89: 913-914, 1965. PubMed: [14273684](#)
 7553: Waller JR, Lichstein HC . Cell permeability: a factor in the biotin-oleate relationship in *Lactobacillus arabinosus*. II. Effect of oleic acid and other surfactants on free biotin uptake. J. Bacteriol. 93: 151-155, 1967. PubMed: [6020402](#)
 9315: Miller A, et al. Deoxyribonucleic acid base composition of *Lactobacilli* determined by thermal denaturation. J. Bacteriol. 102: 278-280,

1970. PubMed: [5437728](#)
- 10275: Birnbaum J, Lichstein HC . Conversion of D-biotin to biotin vitamers by *Lactobacillus arabinosus*. *J. Bacteriol.* 89: 1035-1040, 1965. PubMed: [14276092](#)
- 10737: Strittmatter CF. Electron transport to oxygen in lactobacilli. *J. Biol. Chem.* 234: 2789-2793, 1959. PubMed: [13856390](#)
- 10745: Glaser L. The synthesis of teichoic acids. II. Polyribitol phosphate. *J. Biol. Chem.* 239: 3178-3186, 1964. PubMed: [14245358](#)
- 11064: Waller JR, Lichstein HC . Biotin transport and accumulation by cells of *Lactobacillus plantarum*. I. General properties of the system. *J. Bacteriol.* 90: 843-852, 1965. PubMed: [5847805](#)
- 21480: AOAC International. Vitamin assays, microbiological method. Gaithersburg, MD: AOAC International; AOAC "Official Methods of Analysis of the AOAC International" 960.46.
- 21607: U.S. Pharmacopeia. General Chapters: <91> CALCIUM PANTOTHENATE ASSAY. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeia; USP USP28-nf23, 2005.
- 21610: U.S. Pharmacopeia. General Chapter: <441> NIACIN OR NIACINAMIDE ASSAY. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeia; USP USP28-NF23, 2005.
- 27858: Bringel F, et al. Arginine biosynthesis and regulation in *Lactobacillus plantarum*: the *carA* gene and the *argCJBDF* cluster are divergently transcribed. *J. Bacteriol.* 179: 2697-2706, 1997. PubMed: [9098069](#)
- 28052: Mayo B, et al. Cloning and characterization of *cspL* and *cspP*, two cold-inducible genes from *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 179: 3039-3042, 1997. PubMed: [9139925](#)
- 34645: Birnbaum J, Lichstein HC . Metabolism of biotin and analogues of biotin by microorganisms. 3. Degradation of oxybiotin and desthiobiotin by *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 92: 921-924, 1966. PubMed: [5926759](#)
- 34646: Waller JR, Lichstein HC . Biotin transport and accumulation by cells of *Lactobacillus plantarum*. II. Kinetics of the system. *J. Bacteriol.* 90: 853-856, 1965. PubMed: [5847806](#)
- 58392: Bartido SM, et al.. Lactic acid fermentation of concentrated coconut water. *Proc. Asia-Pacific Biotechnol. Congr.* 1986: 93-99, 1986.
- 58634: Birnbaum J, Lichstein HC . Metabolism of biotin and analogues of biotin by microorganisms. II. Further studies on the conversion of D-biotin to biotin vitamers by *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 92: 913-920, 1966. PubMed: [5926758](#)
- 92233: Dietary Supplements: Oil-and Water-Soluble Vitamins with Minerals Tablets. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeia; USP USP28-NF23, 2005.
- 92408: Applied Biosystems MicroSeq Food Panel #1. Applied Biosystems ABI; MicroSeq

ANEXO 2:
CAPÍTULO 2

Isolado	Equação meio MRS normal	Equação MRS + Oxgall
L4	$y = -0,00036x^3 + 0,0072x^2 + 0,1390x - 0,1919$ $R^2 = 0,94$	$y = -0,00067x^3 + 0,0210x^2 - 0,0137x - 0,0240$ $R^2 = 0,95$
L5	$y = 0,00019x^3 - 0,01509x^2 + 0,3401x - 0,3421$ $R^2 =$	$y = -0,0005488x^3 + 0,02194x^2 - 0,1436x + 0,1875$ $R^2 = 0,96$
L12	$y = 0,000224x^3 - 0,0151x^2 + 0,3236x - 0,3357$ $R^2 = 0,98$	$y = -0,00011x^3 + 0,0061x^2 - 0,03577x + 0,0576$ $R^2 = 0,98$
L19	$y = -0,0050x^3 + 0,01186x^2 + 0,1045x - 0,1715$ $R^2 = 0,96$	$y = -0,00068x^3 + 0,02068x^2 - 0,005186x - 0,0466$ $R^2 = 0,95$
L20	$y = -0,00058x^3 + 0,0147x^2 + 0,0911x - 0,1737$ $R^2 = 0,95$	$y = -0,000645x^3 + 0,02039x^2 - 0,0131x - 0,0243$ $R^2 = 0,96$
L22	$y = -0,00045x^3 + 0,0090x^2 + 0,1532x - 0,2127$ $R^2 = 0,95$	$y = -0,00066x^3 + 0,02060x^2 - 0,0130x - 0,02763$ $R^2 = 0,95$
L23	$y = -0,000489x^3 + 0,0119x^2 + 0,1031x - 0,1614$ $R^2 = 0,95$	$y = -0,0064x^3 + 0,02178x^2 - 0,06463x + 0,0430$ $R^2 = 0,98$
L24	$y = -0,00048x^3 + 0,0107x^2 + 0,1312x - 0,1959$ $R^2 = 0,94$	$y = -0,00063x^3 + 0,01902x^2 + 0,006856x - 0,04748$ $R^2 = 0,95$

Equações de regressão das curvas de crescimento (ufc/ml) dos isolados selecionados cultivados em meio MRS normal e MRS contendo 0,3% de Oxgall.

Isolados	pH 2,0	pH 3,0	Controle
L12	$Y = 5,651 - 2,0693x$ $R^2 = 0,80$	$Y = 6,434 - 0,5843x$ $R^2 = 0,47$	$Y = 6,498 + 0,231x$ $R^2 = 0,60$
L4	$Y = 5,9200 - 2,2263x$ $R^2 = 0,90$	$Y = 6,9120 - 0,2080x$ $R^2 = 0,60$	$Y = 6,818 + 0,188x$ $R^2 = 0,75$
L19	$Y = 4,447 - 1,914x$ $R^2 = 0,60$	$Y = 7,331 - 0,465x$ $R^2 = 0,81$	Não foi possível ajustar equação
L20	$Y = 6,666 - 2,1020x$ $R^2 = 0,98$	Não foi possível ajustar equação	Não foi possível ajustar equação
L22	$Y = 6,435 - 2,0900x$ $R^2 = 0,99$	Não foi possível ajustar equação	Não foi possível ajustar equação
L23	$Y = 4,301 - 1,839x$ $R^2 = 0,58$	Não foi possível ajustar equação	$Y = 7,0116 + 0,120x$ $R^2 = 0,79$
L23	$Y = 5,024 - 2,149x$ $R^2 = 0,60$	Não foi possível ajustar equação	Não foi possível ajustar equação
L5	$Y = 4,5296 - 1,937x$ $R^2 = 0,59$	$Y = 7,0286 - 0,508x$ $R^2 = 0,45$	$Y = 6,8323 + 0,1956x$ $R^2 = 0,70$
<i>L. casei</i>	$Y = 5,678 - 2,300x$ $R^2 = 0,79$	Não foi possível ajustar equação	Não foi possível ajustar equação

1. Anova não significativo a 5% de probabilidade.

Equações de regressão das curvas de crescimento (log ufc/ml) dos isolados expostos ao ácido clorídrico (HCl 0,1 N) por até 3 horas.